

Rostlinné biotechnologie

Biotechnologické metody ve šlechtění rostlin

ČÁST II. - APLIKACE BIOTECHNOLOGICKÝCH METOD
VE ŠLECHTITELSKÝCH POSTUPECH

Vladislav Čurn

1995-2018

Tématické okruhy „Rostlinné biotechnologie II.“

- * Možnosti a perspektivy použití biotechnologií v genetice a šlechtění rostlin. Současné využití biotechnologií u nás a ve světě. Cíle a perspektivy šlechtění polních plodin ve vztahu k rostlinným biotechnologiím.
- * Metody a biotechnologické postupy využívané ve šlechtění. Techniky zachovávající původní genotyp. Techniky zvyšující genetickou variabilitu. Selektce mutantů *in vitro*. Mutageneze *in vitro* a metody transformace genetické informace. Selekcční systémy *in vitro*. Perspektivy GI ve šlechtění rostlin.
- * Kryokonzervace a uchovávání genetického materiálu. *In vitro* genové banky. Způsoby zmrazování, postup kryokonzervace. Genetická stabilita.
- * Využití imobilizovaných enzymových systémů, biotechnologické postupy při získávání sekundárních metabolitů.
- * Regulace biotechnologií. Problematika kontroly a usměrňování biotechnologického výzkumu a aplikací. Nebezpečí negativního ovlivnění vnějšího prostředí, „genetická eroze“. Etické, právní a sociální otázky biotechnologií.
- * Využití RB (KRE) u obilovin, luskovin a olejnin. Důvody využití biotechnologií k dosažení šlechtitelských cílů. Kultury prašníků a mikrospor. Problematika androgeneze a systémy regenerace rostlin, průběh a genetika regulace. Metody haplodizace *in vitro*, srovnání s tradičními technikami. Somatická embryogeneze u obilovin a luskovin. Suspenzní a protoplastové kultury. Vzdálená hybridizace a embryokultury. Využití biotechnologických metod v rezistentním šlechtění.

- * Využití RB u brambor a semenných okopanin. Důvody využití biotechnologií k dosažení šlechtitelských cílů. Ozdravování rostlin *in vitro* od původců houbových a virových chorob. Technologie ozdravování a pěstování zdravého materiálu. Klonování *in vitro*. Tuberizace a tvorba mikrohlízek. Metody odvozování haploidních rostlin - gynogeneze a androgeneze, systémy regenerace. Využívání somaklonální variability. Orgánové kultury, selekce *in vitro*, buněčné suspenze, protoplastové kultury. Dlouhodobé uchovávání kultur *in vitro*.
- * Využití RB u jetelovin a pícních trav. Důvody využití biotechnologií k dosažení šlechtitelských cílů. Metody kultivace *in vitro*, stabilita genotypu. Regenerace z kalusových a suspenzních buněčných kultur. Mikropropagace cenných genotypů, problematika somatické embryogeneze. Metody ozdravování rostlin *in vitro*. Možnosti selekce *in vitro* vůči houbovým chorobám. Vzdálená hybridizace, embryokultury. Produkce triploidních rostlin *in vitro*. Indukce haploidie Studium problematiky fixace N₂.
- * Využití RB u zelenin. Mikropropagace rostlin *in vitro*. Kalusové kultury, somatická embryogeneze a regenerace rostlin. Pylové a prašnickové kultury. Využití biotechnologických metod při tvorbě hybridů. Vzdálená hybridizace, rozšiřování genetické variability a ozdravování u česneku. RB u chmelu.
- * Biotechnologie v lesnictví, využití RB u drobného ovoce a ovocných dřevin. Metody kultivace *in vitro*. Mikropropagace materiálu, otázka stability genotypu a regenerace. Technologie výroby zdravé (viruprosté) jahodníkové sadby.
- * Využití RB u okrasných rostlin. Kalusové a suspenzní kultury. Mikropropagace *in vitro*. Problematika organogeneze a somatické embryogeneze. Regenerace rostlin, somaklonální variabilita.

Použité zkratky:

| | |
|-----|----------------------------------|
| RB | rostlinné biotechnologie |
| SE | somatická embryogeneze |
| GI | génové inženýrství |
| GMO | geneticky modifikované organismy |
| TK | tkáňová kultura |
| KRE | kultury rostlinných explantátů |
| CMS | cytoplasmatická pylová sterilita |

Využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* v genetice a šlechtění

I. Hlavní směry rozvoje biotechnologických metod

Objevy učiněné v posledním období nejprve v **buněčné biologii** a později v **molekulární biologii** měly velký vliv na rozvoj celého komplexu nových metod a technik, obecně nazývaných **rostlinné biotechnologie**.

Termín rostlinné biotechnologie je (nebo byl) velmi často používán ve smyslu určitého zaklínadla. Mnohdy došlo k přecenění možností, které RB nabízely nebo umožňovaly, RB se tak dostaly do role určitého „všeléku“ na mnohé problémy zemědělství (šlechtění rostlin, kombinace vhodných znaků až konstrukce nových komplexů vlastností, překonání nevhodných pěstitelských podmínek, zpracování rostlinných produktů a odpadů z výroby...). Před RB byly tak postaveny nereálné cíle a komplex biotechnologických metod se naopak postupem času začal neprávem zavrňovat.

Měli bychom si ukázat, co je náplní rostlinných biotechnologií (**RB**), jaké jsou možnosti a perspektivy jejich využití.

V prvé řadě bychom si měli vyjasnit co budeme myslet pod pojmem „**RB**“ v tomto předmětu - zejména ve spojení se zemědělstvím a potravinářským průmyslem se k původní nebo resp. moderní definici nabalovaly další a další činnosti a obory, mnohdy jen proto, že biotechnologie byly přímo zaklínadlem. Tak sem patří biotechnologie pěstování zemědělských plodin, chovu hospodářských zvířat, jedny z nejstarších „biotechnologií“ (i když v době vzniku a ještě dlouho potom se takto neoznačovaly) - výroba piva, vína, potravinářských výrobků, v souvislosti se zpracováním odpadů je to i kompostování chlévské mrvy a domovních odpadů.

Pod termínem RB v genetice a šlechtění rostlin si proto budeme představovat „**kultury rostlinných explantátů *in vitro***“, t.j. aseptickou kultivaci

izolovaných částí rostlin za umělých podmínek, a další s tím související techniky - metody **transformace rostlin, GI, imobilizace rostlinných buněk**.

Na počátku rozvoje RB, když se objevily jejich nové možnosti, se do nich kladly velké naděje a finanční prostředky. Postupem času pak počáteční nadšení a euforie poněkud opadla, objevily se mnohé problémy - zejména v aplikaci laboratorních experimentů do praxe. Nyní se vypracovávají střízlivější projekty a RB se přikládá ve světě stále velký význam.

Nicméně rychlý rozvoj biotechnologických metod ale nijak nesnižuje význam klasických šlechtitelských metod.

Tradiční - klasické šlechtitelské metody jsou primárně založeny na kombinování zajímavých znaků a vlastností po křížení rodičovských rostlin. Tento přístup má ale několik omezení - **intra-** a **interdruhovou kompatibilitu**, (resp. inkompatibilitu) možnou **nestabilitu** nových kombinací genů během množení získaných genotypů a poměrně **dlouhou dobu rozmnožovacího cyklu**. Šlechtitelský selekční program, v závislosti na druhu rostliny, zahrnuje 5 - 15 cyklů pohlavního rozmnožování. Zkrácení doby šlechtění je možné při pěstování některých generací ve sklenících, nebo střídavým pěstováním na severní a jižní polokouli. U vytrvalých rostlin, či dřevin, které se pohlavně mohou rozmnožovat až po několika letech, je tento problém ještě výraznější. Těmito tradičními metodami také není možné kombinovat geny praktického významu ze dvou inkompatibilních rostlin. Zcela nemožné je získání rostlin s geny pocházejícími z nerostlinných zdrojů (mikroorganismů - *např. rezistence vůči herbicidům, hmyzu; živočichů - geny pro luciferázu...*). Například vnesení genu kódující patatin, bílkovinu brambor s vynikající nutriční hodnotou, do druhů produkujících velké množství bílkovin - sója, kukuřice - je nemožné při používání konvenčních šlechtitelských metod.

Kompatibilita (resp. inkompatibilita), **stabilita** a **délka šlechtitelského cyklu** jsou 3 nejdůležitější faktory limitující účinnost konvenčního šlechtění. Jakýkoli postup, který **zcela** nebo jen **částečně překonává tato omezení**, představuje **pokrok v oblasti šlechtění rostlin**.

Z tohoto pohledu mají biotechnologie tři základní praktické dopady:

- ◆ zvýšení genetické variability jiným způsobem než pohlavním rozmnožováním
- ◆ množení genotypů, které jsou nestabilní při pohlavním rozmnožování
- ◆ snížení počtu nebo délky šlechtitelských cyklů potřebných v selekčním programu.

Počátek rostlinných biotechnologií můžeme datovat do třicátých - čtyřicátých let - ale teprve v letech sedmdesátých se začaly objevovat první praktické výsledky (v souvislosti s rozvojem buněčné biologie) a od počátku osmdesátých let se rozvíjí techniky molekulární biologie.

V současné době se komerčně otázkou RB zabývá asi 500 firem a 150 - 200 výzkumných ústavů a pracovišť.

Obr. - Historický vývoj rostlinných biotechnologií

| Výzkum | | Praktické použití |
|--|------|---|
| Přímý přenos DNA do intaktní rostliny | 1986 | Nová odrůda zelí jako produkt fúze protoplastů |
| Expresce cizího genu kódujícího „užitečnou“ vlastnost v rostlině | 1985 | Nová odrůda pšenice vytvořená haploidní technikou (F) |
| Přímý přenos DNA do rostlinného protoplastu | 1984 | Patentování rostlinného genu (USA) |
| Expresce cizího genu v rostlině | 1983 | Patentování umělých semen |
| | 1979 | Patent - imobilizace rostlinných buněk (FRG) |
| | 1975 | Nová odrůda rýže (Čína) a tabáku (Japonsko) - haploidní technika |
| Integrace Ti plasmidu do rostlinného genomu | 1974 | |
| Regenerace rostliny z produktu fúze protoplastů | 1972 | |
| Kryoprezervace rostlinné buněčné suspenze | 1968 | Vytvoření první komerční společnosti - produkce rostlin vegetativní propagací <i>in vitro</i> |
| Haploidní rostlina regenerovaná z prašnickové kultury | 1964 | |
| Izolace protoplastů enzymatickou metodou | 1960 | |
| Regenerace celistvé rostliny somatickou embryogenezí | 1958 | |
| | 1955 | Patent na bioreaktor - rostlinná buněčná kultura (USA) |
| Buněčná suspenze v tekutém médiu | 1954 | Počátek využívání meristémových kultur - produkce bezvirózních rostlin |
| Bezvirózní rostlina odvozená z meristémové kultury | 1952 | |
| Zjištění absence virů v meristematických strukturách | 1949 | |
| Regenerace celistvé rostliny z apikální struktury | 1946 | |
| Neomezený růst neorganizované rostlinné tkáně | 1939 | |
| První pravá rostlinná tkáňová kultura | 1934 | |
| Buněčná teorie | 1838 | |

V současné době je hlavní pozornost věnována následujícím oblastem:

1. - *propagace rostlinného materiálu = in vitro klonování*

rostliny mohou být získávány následujícími technikami:

- mikropropagace - regenerace rostlin *in vitro* z kultivovaných meristémů
- somatická embryogeneze
- adventivní pupenotvorba (organogeneze)

Těmito postupy se získává identický materiál (zcela na 100% neplatí u organogeneze), nejrozšířenější a komerčně nejúspěšnější aplikací RB je rychlé a mnohonásobné klonové množení rostlin meristémovými kulturami - je využíváno u okrasných rostlin (tam, kde je tento způsob levnější a rychlejší než množení semeny) - orchideje, kapradiny, u pokojových rostlin a dřevin, u ovoce - jahodník, u zeleniny, léčivek, dřevin - jehličnany, rhododendrony. Ve šlechtění se této metody používá k namnožení cenných genotypů (jetel, vojtěška), sterilních hybridů.

Jestliže např. u brambor se dosahuje při šlechtitelské práci množitelského koeficientu 1:5-10, u obilovin 1:100–200 a u hrachu 1:500, tak při využití metod explantátových kultur je možné dosáhnout koeficientu 1:500 000 až 1:1 000 000 (teoreticky u některých materiálu až 1:10⁹). Tímto způsobem je pak možné urychleně namnožit cenné genotypy vybraných superelitních rostlin při zachování jejich genetických vlastností a docílit tak morfologické a fenologické vyrovnanosti populace, ale i podstatné urychlení nástupu nové odrůdy do praxe.

Uvažuje se, že nejužitečnější aplikací této technologie bude množení dřevin - výroba sazenic pro zalesňování devastovaných oblastí. K zalesňování v celosvětovém měřítku je zapotřebí několika biliónů rostlin a toto je metoda, která po automatizaci explantátových technik může produkovat prakticky neomezené množství rostlinného materiálu.

Výhodným postupem pro množení se zdá být somatická embryogeneze (**SE**) - při kultivaci somatických buněk *in vitro* dochází k jejich dediferenciaci a po

navození specifických kultivačních podmínek buňky začínají vytvářet somatická embrya. Výsledný organismus je málo ovlivněn vlivy působícími v *in vitro* kultuře. Somatická embrya vznikají z 1 buňky, poměrně rychle, bez velkého časového mezidobí ve fázi kalogeneze. Nevýhodou je, že ne od všech genotypů lze získat embryogenní kultury s dostatečným koeficientem propagace.

V souvislosti s technikou SE se objevila možnost produkce umělých semen - synchronizovaná indukce tvorby somatických embryí v tekutém médiu, ve vhodné fázi jejich vývoje enkapsulace a použití jako (umělého obalovaného) osiva.

Další aplikací těchto propagačních technik je např. získávání nových a udržení stávajících genotypů s CMS - u cukrovky, pak není třeba udržovat pylové sterility, sterilní mateřská komponenta se množí vegetativně.

2. - produkce bezvirózních rostlin

(resp. produkce zdravých rostlin - tímto postupem lze eliminovat i jiné fytopatogeny)

Meristém a tedy i meristémová kultura neobsahuje buď žádné virové částice, nebo jen velmi malé množství (i toto tvrzení je ale už sporné, protože u některých virů se uvažuje, že infikované jsou již i buňky vzrostného vrcholu nebo dokonce i iniciála - ale koncentrace virových částic je ve srovnání se zbytkem rostliny malá a několikerým opakováním kultivačních postupů lze získat bezvirózní rostliny).

Při kultivaci a ozdravování se vypreparuje a odřízne vrcholový meristém s 1 nebo 2 listovými primordií. Čím menší je meristém, tím větší je šance, že získáme bezvirózní materiál, ale je obtížnější kultivace. Takovýto bezvirózní meristém může být v *in vitro* kultuře namnožen mikropropagací. Regenerované rostliny pak neobsahují viry (zkouška se provádí většinou ELISA-testem, uvažuje se i o DNA detekci - zejména u hůře detekovatelných patogenů).

Tímto způsobem lze fyzikální cestou eliminovat viry - je možná i kombinace s chemo- nebo termoterapií (ale pak mohou být problémy s růstem *in vitro* a regenerací).

Použití těchto technik je zejména u brambor, jahodníku, cukrovky, cukrové třtiny, kasavy (maniok), česneku, banánů, ovocných dřevin, zelenin, jetelovin.

3. - embryokultury

Využití je zejména při získávání hybridních rostlin po křížení více či méně příbuzných rostlin (vzdálená hybridizace). V mnoha případech po takovémto křížení dojde k oplození, ale vyvíjející se embryo abortuje v různé fázi vývoje.

Při technikách embryokultur se nezralé embryo extirpuje, kultivuje se *in vitro* - na agarovém médiu, nebo se používá metoda chůvy (trávy, jetele), získá se hybridní rostlina. Další namnožení hybridů je možné mikropropagací.

Ve VÚRV se této techniky využívá při realizaci projektu přenosu rezistence ke rzi pšeničné a padlí travnímu z *Triticum monococcum*.

4. - indukce tvorby haploidů

Haploidní rostliny byly získány z kultivovaných prašníků, mikrospor a semeníků u více než 100 druhů rostlin. Androgeneze je vlastní alternativní vývojová cesta vedoucí k tvorbě rostlin s gametickým (haploidním) počtem chromozómů z mikrospor.

Haploidní gametofytické buňky jsou stimulovány k tvorbě buď přímo embryí (přímá pylová embryogeneze) nebo k tvorbě kalusu. V kalusové kultuře pak dochází k indukci tvorby pupenů (organogeneze) nebo indukci tvorby som. embryí a následné regeneraci nových rostlin - pak se jedná o nepřímou androgenezi. Během indukce a kultivace kalusu se projevuje vysoké procento indukce genových změn, které mají za následek nárůst genetické variability (genové mutace, chromozómové přestavby, aneuploidie, genomové změny, chimerické sektory na

regenerovaných rostlinách). Po regeneraci rostlin jsou pak nutné cytologické, biochemické kontroly.

Faktory ovlivňující indukci androgeneze *in vitro* a výtěžnost rostlin v prašnických a pylových kulturách jsou následující:

- * - vývojové stadium mikrospor (střední až pozdní fáze jednojaderné mikrospory)
- * - vliv genotypu
- * - vliv indukčního a regeneračního media
- * - předkultivační podmínky a kultivační zásahy
- * - růstové podmínky donorových rostlin
- * - regenerace haploidních rostlin a problematika albinismu (např. u pšenice procento albinózních rostlin dosahuje 20-40%, rýže 20-60%, ječmene 30-90%, regenerace albinózních rostlin se objevuje hlavně u jednoděložných rostlin a může být spojena s delecemi částí plastidové DNA).

Po zdvojení počtu chromozómů haploidních rostlin je možné získat homozygotní diploidy (izogenní linie) - fertillní, které je možno využít ve šlechtitelských programech. Touto metodou byly získány nové odrůdy u pšenice (**Florin, Huapei 1, Jinghua 1**), rýže (**Xin Xiou, Hua Yu, Tanfene 1, Zong Hua 2**), kukuřice, tabáku (**Tan Yuh 1, Tan Yuh 2, Tan Yuh 3**), řepky olejky. U ječmene byly vyšlechtěny odrůdy **Mingo, Rodeo, Gwylan** a **Doublett** z haploidů získaných metodou eliminace chromozómů při křížení s *Hordeum bulbosum*. V blízké budoucnosti se očekává získání odrůd, vzniklých technikami haplokultur u cukrovky, slunečnice, melounu, lilku (baklažánu), papriky.

5. - selekce a mutageneze *in vitro*

Je prokázáným faktem, že během dělení buněk a diferenciaci *in vivo* se objevují spontánní mutace. Meristematické buňky „zárodečné linie“ jsou obecně imunní k takovýmto genetickým změnám. Při normálním životním cyklu rostliny

jsou mutované somatické buňky eliminovány během pohlavního rozmnožování a mutace se nepředávají a neprojevují v potomstvu. Tyto mutované buňky ale mají vynikající příležitost dělit se a namnožit se (stejně jako nemutované) při kultivaci *in vitro*.

Selekční tlak na kultivované buňky může mít za následek přednostní růst mutovaných buněk - lze pak regenerovat rostliny s mutovaným genotypem. Tento postup je vhodný pro geneticky jednoduše založené znaky (jedním genem) - jako je např. rezistence/tolerance k některým patogenním toxinům, herbicidům, metabolickým produktům, těžkým kovům. Takto lze také získat mutanty, kteří se vyznačují nadprodukcí některé látky - např. některých aminokyselin, biologicky účinných látek (kukuřice - mutace *opaque-2* - vyšší obsah lyzinu, je to vlastně tolerance vůči vyššímu obsahu dané AA).

Otázkou je, zda se na úrovni intaktní rostliny budou projevovat vlastnosti, které zjistíme v buněčné kultuře a na které buněčné klony selektujeme - zatím tomu tak většinou není. Zatím se nepodařila cílená selekce mutantů ve znacích jako je výnos, růst - zejména z toho důvodu, že tyto vlastnosti jsou komplexní, podmíněné mnoha geny. Není známa metoda, dovolující souběžnou selekci *in vitro* na využitelné mutace mnoha genů.

Hovoří se také o potenciálním využití **somaklonální variability** ve šlechtění rostlin. Variabilita projevující se u buněk kultivovaných *in vitro* pochází buď z preexistující variability rostlinných diferencovaných somatických buněk nebo z nově vzniklých mutací během růstu v *in vitro* kultuře. Velmi nízký podíl variability nalezené v buněčné kultuře se projeví i v regenerovaných rostlinách a téměř všechna je buď nevyužitelná nebo podobná variabilitě objevující se po křížení nebo mutagenezi.

6. - produkce sekundárních metabolitů

Dlouhé období se uvažovalo, že rostlinné buňky kultivované ve velkých bioreaktorech jsou ideální cestou k získání farmaceuticky zajímavých

sekundárních metabolitů. Ale nepříznivá pro tuto myšlenku je zejména velmi vysoká cena produkce, omezená možnost realizace, mnohdy nízký obsah cílových látek v kultuře. Jediným produktem vyráběným touto technologií pak zůstává pouze šikonin (komerčně vyráběn v buněčné suspenzní kultuře *Lithospermum erythrorhizon* - Mitsui Petrochemicals Industries, Japan 1983).

Pro komerční využití se vyvíjí technologie pro získávání berberinu z *Coptis japonica*, biomasy a saponinů z *Panax ginseng*, peroxidáz z *Raphanus* sp., kys. rosmarinové z *Coleus blumei*, digoxinu z *Digitalis lanata* (biotransformací). Zkoumají se také možnosti využití imobilizace rostlinných buněk a využití imobilizovaných rostlinných systémů pro produkci nebo biotransformaci některých látek (digitoxin na digoxin).

7. - somatická hybridizace fúze protoplastů

Byla po dlouhé období propagována jako zásadní metoda pro produkci hybridních rostlin - tam, kde je nelze získat normálním křížením. Ale pouze několik somatických hybridů je opravdu využitelných: *Brassica naponigra* - vznikla po fúzi protoplastů *B. napus* a *B. nigra*, odolná vůči houbě *Phoma lingam*, somatický hybrid *Solanum tuberosum* a *S. brevidens* je rezistentní vůči některým virovým chorobám.

Obecně není možné získávat fertillní somatické hybridy jednoduchou kombinací - splynutím kompletních genomů dvou příbuzných nebo nepříbuzných druhů. Zkouší se metody asymetrické hybridizace - nejlepší využití fúze protoplastů asi bude v produkci cybridů, kteří obsahují jaderný a cytoplazmatický genom jednoho rodiče a jen cytoplazmatický genom druhého rodiče. Tato metoda může mít význam v přenosu CMS při šlechtění rostlin. Při přenosu CMS z *Raphanus sativus* do *Brassica napus* nebo *B. oleracea* se projevuje tzv. „chilling“ efekt (= chladový efekt) - při teplotách pod 15°C žloutnou listy, je nižší intenzita

fotosyntézy. Odstranění „chilling“ efektu je možné výměnou plastidů *Raphanus sativus* za plastidy *Brassica napus* nebo *B. oleracea*.

8. - další oblastí RB je přenos, stabilní integrace a exprese určitých genů v kulturních rostlinách.

Tyto techniky jsou v současné době velmi usilovně propracovávány a vyvíjeny a jejich komerční využití lze očekávat v příštích 5 - 10 letech. Již dostupné jsou metody založené na transformaci kultivovaných tkání, buněk a protoplastů pomocí Ti-plasmidu *Agrobacterium tumefaciens* a Ri-plasmidu *A. rhizogenes*. Zkouší se metody přímého přenosu DNA do protoplastů - PEG a elektroporace, vnášení DNA do intaktních buněk mikroinjekcemi, nebo pomocí mikroprojektilů.

V současné době je ale dostupných jen několik genů, které mají agronomický význam a již byly integrovány do některých rostlin. Jsou to geny rezistence vůči několika ekologicky „čistým“ herbicidům, gen pro δ -endotoxin *Bacillus thuringiensis* a geny rezistence vůči virům. Transgenní rostliny se podařilo získat u soji, brambor, rajčat, tabáku, řepky, některých obilovin. Zatím nejsou známy informace o výnosu, kvalitě transgenních rostlin, ale dá se očekávat, že se komerčně objeví během 5-10 let. První transgenní rostliny se objevily již v roce 1983.

U zemědělsky významných plodin (obiloviny, luskoviny) je jejich získávání obtížnější, zejména pro obtíže při regeneraci rostlin a z důvodů obtížné transformovatelnosti. Byly již získány rostliny kukuřice, rýže a soji obsahující gen pro rezistenci ke kanamycinu a dá se očekávat, že v blízké budoucnosti se podaří do těchto rostlin začlenit hospodářsky významné geny (r.1992 - pšenice, kukuřice - gen rezistence vůči PPT - „Basta“ pomocí mikroprojektilů). Do rostlin tabáku se podařilo začlenit gen pro toxin *B. thuringiensis* a tvorba toxinu byla zjištěna i u potomstva po generativním rozmnožování.

Transgenní rostliny mohou být využity i jako „přírodní bioreaktory“ pro produkci celé škály biologicky aktivních peptidů, tvorbu chimerických proteinů - včetně neuropeptidů, krevních faktorů, růstových hormonů.

Pro další rozvoj moderních metod RB je nutné dozvědět se více o růstu a vývoji rostlin, struktuře, funkci a expresi agronomicky důležitých genů, propracovat techniky transgenozy:

- * zatím většina agronomicky důležitých genů nebyla identifikována na molekulární úrovni nebo nebyla klonována
- * většina důležitých hospodářských vlastností je polygenně založena
- * metody transformace dovolují integraci jen několika cizích genů (obecně 1 nebo 2)
- * geny jsou integrovány do genomu hostitelské rostliny často v několika kopiích na několik náhodných míst (to může vyústit v poruchy genové regulace, snížení aktivity vnesených i jiných genů, faktickou neopakovatelnost transformačních experimentů).

Rostlinné biotechnologie se do budoucna zajisté stanou **doplňkem a součástí konvenčních šlechtitelských programů**. V úzké spolupráci biotechnologů a šlechtitelů je pak možné přenést řadu úspěchů z laboratoří do praxe.

V souvislosti s rozvojem RB a zejména technik rekombinantní DNA - přenos cizorodých genů do rostlin a pak zejména do zemědělských plodin - se objevuje otázka přísné kontroly geneticky modifikovaných organismů (GMO) a jejich možné nebezpečí pro člověka a jeho zdraví. Transgenní rostliny a jejich produkty jsou dále zpracovávány nebo přímo slouží jako potraviny. Dochází tak ke konzumaci rostlin nebo jejich částí s modifikovanými nebo vnesenými cizími geny, nebo přímo i ke konzumaci produktů GMO-mikroorganismů nebo přímo těchto pozměněných

mikroorganismů (víno, jogurty, sýry). Zkoumá se i vliv GMO na okolní prostředí - možnost úniku „umělých“ genů nebo genových konstrukcí do prostředí, při hybridizaci GMO s planými druhy přenos nových vlastností do plané flóry, plevelů...

II. Cíle a perspektivy šlechtění polních plodin ve vztahu k RB.

V posledním období 10-15 let byly na výzkumných pracovištích propracovány metody kultivace a opakovatelné regenerace řady hospodářsky významných druhů rostlin. To bylo základním předpokladem pro využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* jako nové metody množení a šlechtění rostlin. Komplex těchto metod se ve větší či menší míře využívá u řady polních, zahradních a okrasných rostlin.

Začleněním metod explantátových kultur do šlechtitelského a semenářského procesu se dociluje především:

- rychlé **namnožení** cenných genotypů rostlin vytvořených v procesu šlechtění a tím i rychlejší tvorba nových výkonných odrůd
- **ozdravení** šlechtitelských materiálů od patogenů (zejména původců virových a houbových chorob) a tím zvýšení výnosů a snížení ztrát
- **překonání nezkřížitelnosti** systematicky vzdálených rostlinných taxonů (druhů, rodů)
- vyšlechtění nových genotypů **dlouhodobé udržování** genetických zdrojů v kultuře *in vitro* a tím podstatné zlevnění a zrychlení šlechtitelského procesu
- možnost **indukce** vzniku **mutantů a polyploidních** rostlin a tím získání nových genotypů odrůd v kratším čase
- možnost využití **předselekcce** v kultuře *in vitro* urychlení a zkvalitnění šlechtitelské práce
- získání nových a udržení existujících genotypů **s pylovou sterilitou**
- podstatné **zkrácení** šlechtitelského procesu
- možnost produkce **haploidů** androgenezí a gynogenezí *in vitro*
- rychlejší získávání výchozího šlechtitelského materiálu pro tvorbu nových odrůd
- možnost konstrukce zcela **nových genotypů** kulturních rostlin
- umělé sestavování žadoucích znaků a vlastností **při využití metod GI**

Předpokladem využití těchto biotechnologických metod ve šlechtění a semenářství a množení rostlin předpokládá existenci **spolehlivě fungujících**, dobře **rozpracovaných** metod **kultivace, propagace a regenerace rostlin in vitro**. Metod, které budou „fungovat“ u široké škály genotypů (zde je právě velký problém, protože ne všechny genotypy daného druhu nebo odrůdy reagují stejně a při mnohých manipulacích *in vitro* se projevuje silná genotypová závislost).

Dalším předpokladem pro širší zavedení těchto metod je i materiálně technické vybavení na odpovídající úrovni a kvalitní personální obsazení. Také je nutná úzká spolupráce mezi biotechnology, genetiky a šlechtiteli - kteří jsou často spíše konkurenty a soupeři než spolupracovníci. Mnoho programů ztroskotává na tom, že výsledky biotechnologických manipulací (*in vitro* regenerované rostliny, získané somaklony ...) nejsou začleňovány do šlechtitelských programů.

Explantátové kultury se poměrně široce uplatňují zejména v množení okrasných rostlin a dřevin (pokojevých i zahradních), produkce rostlin z TK je např. v NL udávána na několik desítek až stovek miliónů rostlin ročně. V poněkud menší míře (i menší než se očekávalo) se TK uplatňují při novošlechtění polních a zahradních plodin, a v systémech udržovacího šlechtění - zejména vegetativně množných druhů.

V sedmdesátých letech byla vytvořena i koncepce tzv. *explantátového šlechtění* - tj. program využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* ve šlechtění. Explantátové šlechtění bylo definováno jako šlechtitelská metoda, při níž se na konečném výsledku (šlechtitelském produktu) významnou měrou podílí kultura explantátů *in vitro*.

Nyní jsou kultury rostlinných explantátů a i metody molekulární biologie považovány spíše za pomocné metody, které **napomáhají urychlovat a zkvalitňovat šlechtitelský proces**.

Předpoklady uplatnění metod explantátových kultur, metod GI u jednotlivých plodin jsou následující:

pšenice - využití haploidů je neúčinnější a nejrychlejší cestou získávání vyrovnaných homozygotních linií u pšenice, v *in vitro* kultuře je možno navodit i rozsáhlou genetickou variabilitu - získané somaklony pšenice mohou být využity jako výchozí šlechtitelský materiál

ječmen - tvorba linií u ječmene je možná využitím metody androgeneze *in vitro* nebo indukci haploidů po křížení s *Hordeum bulbosum*. Výtěžnost haploidů při využití obou metod udávají někteří autoři jako přibližně stejnou

kukuřice - využití androgeneze *in vitro* pro získávání haploidů - tvorba homozygotních linií u kukuřice. U šlechtitelsky významných linií (i získaných klasickým způsobem) se objevuje možnost využití somatické embryogeneze pro rychlé namnožení identického materiálu

luskoviny - vypracování metod selekce *in vitro* (rezistence k chorobám a stresovým faktorům, změna složení zásobních proteinů), metody GI - zásobní proteiny, vypracování metod androgeneze a gynogeneze *in vitro*, metod SE - množení geneticky a šlechtitelsky cenných materiálů

řepka olejka - využívají se metody androgeneze *in vitro* pro tvorbu homozygotních (izogenních) linií, sekundární SE pro rychlé namnožení vybraných genotypů, vypracování metod selekce *in vitro* na buněčné úrovni a manipulace s protoplasty - odolnost chorobám, změna spektra mastných kyselin, barva osemení...

len - vypracování systémů regenerace *in vitro*, metody SE, selekce na buněčné úrovni

brambory - vytvoření genotypů brambor odolných proti chorobám při zachování všech dalších hospodářsky významných vlastností. Indukce a selekce rezistentních (tolerantních) genotypů na úrovni buněčných a protoplastových kultur. Metody indukce haploidů - androgeneze *in vitro*, vzdálená hybridizace (*S. phureja*)

cukrovka - metody mikropropagace *in vitro*, indukce haploidů a tvorby homozygotních linií, rozšíření genetické variability

jeteloviny - metody mikropropagace a ozdravování *in vitro*, SE - množení cenných genotypů elitních rostlin, protoplastové kultury - SE, metody GI - přenos cizorodé DNA, selekce *in vitro* - rezistence patogenům, herbicidům, stresům, vzdálená hybridizace - metody embryokultur

pícní trávy - tvorba výchozího šlechtitelského materiálu po mezirodovém a mezidruhovém křížení - využití metod embryokultur, metody polyploidie *in vitro*, SE, mikropropagace a ozdravování *in vitro*

ovoce - produkce bezvirózních rostlin u jahodníku, ovocných dřevin, drobného ovoce, mikropropagace *in vitro*

zelenina - využití haploidů pro tvorbu homozygotních linií (androgenezí - u papriky, mrkve, brukvovité zeleniny, gynogenezí u cibule), mikropropagace materiálu po křížení, embryokultury, produkce bezvirózních rostlin a rozšiřování genetické variability u česneku

V oblasti genetických zdrojů představuje uplatnění explantátové techniky v zásadě dvě skupiny problémů:

- * - uchování genofondu
- * - tvorbu nových genetických zdrojů.

Uchování genofondu je náročný a pro budoucnost nesmírně významný problém. Nároky na organizaci práce a prostředky vynakládané na tento úkol jsou značné zvláště u cizosprašných kultur. Běžnou technikou je využívání meristémových kultur k dlouhodobé konzervaci genetických zdrojů v genových bankách,, udržování materiálů při snížené teplotě (prodloužení subkultivačního intervalu). Uplatnění běžně pasážovaných explantátových kultur při konzervaci genofondu je limitováno variabilitou rostlinného materiálu. Většina karyologických a cytogenetických prací na kalusových a suspenzních kulturách totiž potvrzuje, že

kultury *in vitro* jsou vysoce heterogenní systémy, odrážející ve své genetické konstituci jak stav primárního explantátu, tak i vlivy kultivačních podmínek *in vitro*. Důsledků na cytologické úrovni je tolik, že představují prakticky celou škálu popsaných jevů: polyploidní, aneuploidní, haploidní i subhaploidní stav, chromozomální aberace, genové mutace. Tyto cytogenetické nestability narušují nejen obraz kalusu, ale i jeho použitelnost při uchování genofondu snížením organogenetické schopnosti a změnou genového typu regenerantů. Pesimistický pohled ale zmírňuje řada opačných zjištění, z nichž nejdůležitější je, že cytogenetické alterace kalusů i regenerantů lze manipulací kultivačních podmínek a výběrem primárního explantátu buď vylučovat, nebo usměrňovat. Uvedené skutečnosti nemají vztah jen k problematice konzervace genofondu, ale k celé šíři využívání kalusových a buněčných kultur *in vitro*, protože v interpretacích fyziologických a biochemických pokusů jsou kultury *in vitro* vhodné jen tehdy, je-li *a priori* potvrzen jednotný karyologický obraz.

Uplatnění explantátů v oblasti genetických zdrojů má vztah i k tvorbě zdrojů nových, které zejména u vegetativně množených druhů mohou mít zásadní význam v novošlechtění.

Uplatnění kultur rostlinných explantátů *in vitro* v novošlechtění zasahuje řadu klasických i moderních šlechtitelských postupů. Jako příklad kombinačního šlechtění s použitím monoploidie a embryokultury *in vitro* lze uvést tabák a zejména ječmen. Při vzniku homozygotní linie je možné ušetřit 4-5 šlechtitelských generací a potřebné množství materiálu řádově podstatně snížit. Liniové a heterózní šlechtění zvláště cizosprašných druhů má prioritní místo ve šlechtitelských programech i produkci. Jeho efekt je vázán na obrovský rozsah materiálu a časovou a technickou náročnost při tvorbě homozygotních linií. Možnost získávat linie v izogenním stavu pomocí diploidizace androgenních haploidů znamená efektivní ušetření nákladů na rozsah experimentů i eliminaci řady generací autogamií. Tento způsob lze kombinovat s klasickými metodami. Nicméně zůstává skutečností, že hromadná produkce haploidů androgenetickou cestou je zatím omezena jen na některé druhy. Významné je využití explantátových kultur v intenzivním množení linií, zvláště v těch případech, kdy jejich udržování je komplikováno autoinkompatibilitou, sterilitou, inzuchtní depresí.

V mutačním a polyploidním šlechtění se explantáty uplatní nejméně dvěma způsoby: - jako metoda rozchimérování generace M (po samoopylení v M generaci se v důsledku diplontické selekce ztrácí řada cenných mutací) - při přímé indikaci mutací aplikací mutagenů na kulturu *in vitro* (v haplofázi, nebo regenerace mutantů SE - pak nejsou chiméry).

V selekčním systému *in vitro* je pak možná detekce mutantů, a to již na buněčné úrovni.

Při vzdálené hybridizaci jako metodě novošlechtění se nabízejí tři možnosti použití explantátových kultur:

- kultivace embryí *in vitro*, při překonávání nutriční inkompatibility embryo-endosperm z druhově vzdálených kombinací
- oplození a opylení *in vitro*, které umožňuje překonávat bariéry inkompatibility i nekřížitelnosti až po určitou hranici
- izolace a heterologní fúze protoplastů s následnou regenerací parasexuálních hybridů.

Vzdálená hybridizace, usnadněná aplikací metodických postupů explantátové kultury, by se mohla stát skutečně jedním z nejperspektivnějších směrů šlechtění, zejména v oblastech rezistentního šlechtění a v oblastech vytváření zcela nových typů rostlin, kdy je nelze nahradit jinými metodami.

Značné teoretické možnosti představují zásahy do genetické konstituce buněk a protoplastů. Stále jsou snahy o přenos genů řídících fixaci vzdušného dusíku do genotypu vyšších rostlin. Ve šlechtění na znaky a vlastnosti se mohou explantátové kultury uplatnit jednak v detekčních metodách (rezistentní šlechtění, výběry z buněčných populací), jednak při sledování korelačních vztahů organismu k izolovaným orgánům, pletivům, buňkám, protoplastům.

Explantátové metody by tak měly umožnit vhodné doplňování klasických šlechtitelských postupů.

Problematika uplatnění explantátů v udržovacím šlechtění a množení spočívá ve využití intenzivních metod množení cenných genotypů meristémovými a kalusovými kulturami *in vitro*. Součástí těchto programů je i získávání viruprostých materiálů - což jsou poměrně propracované metody u karafiátů,

chryzantém, jahodníku, brambor, česneku.... U orchidejí představují kultury *in vitro* základní metodu komerčního využití.

Perspektivy GI ve šlechtění rostlin lze spatřovat zejména ve:

- * - vnášení nových genů do rostlinného genomu
- * - prostřednictvím vektorů virových, bakteriálních, přímé vnášení DNA do protoplastů, buněk
- * - modifikacích genomu symbiotických a patogenních mikroorganismů
- * - využití specifických klonů rekombinované DNA pro detekci těžko diagnostikovatelných patogenů

Praktické využití metod GI je orientováno zejména na:

Odolnost proti virovým chorobám

- získání odolnosti je možné po vnesení sekvencí DNA kódující gen pro plášťový protein viru, celý genom slabého kmenu viru, antisence RNA, virovou satelitní RNA, sence RNA

Odolnost herbicidům

- glyfosát, fosfinotricín

Odolnost proti hmyzu

- gen pro specifický toxin vůči některým skupinám hmyzu z *Bacillus thuringiensis*

Zlepšení spektra aminokyselin v zásobních bílkovinách

Navození rezistence vůči hád'átku u brambor a řepy

Zvýšení odolnosti proti fyzikálním stresovým faktorům

III. Metody a biotechnologické postupy využívané ve šlechtění.

Komplex metod založený na kultivaci a manipulaci s rostlinnými explantáty *in vitro* představuje v současnosti nový netradiční doplněk klasických šlechtitelských postupů při šlechtění kulturních rostlin.

Šlechtitelské biotechnologické metody vychází z těchto základních principů:

- - velké populace totipotentních buněk (= každá buňka je potencionálním zdrojem celého rostlinného organismu) je možné dlouhodobě kultivovat a za kontrolovatelných podmínek regenerovat rostliny
- buněčná kultura je potenciálním zdrojem genetické variability (kultivované buňky *in vitro* jsou geneticky a chromozomálně nestabilní), genetickou variabilitu je možné i uměle zvyšovat použitím mutagenů a po navození regenerace v takto ovlivněné kultuře lze získat rozsáhlou genetickou proměnlivost u intaktních rostlin regenerovaných *in vitro*
- geneticky různorodá buněčná kultura může být vystavena selekčním podmínkám. Pod značným selekčním tlakem se selektují buňky, nesoucí určitou změnu (mutaci) - projev znaku na buněčné úrovni se může projevit i po regeneraci na úrovni rostliny, případně tento znak může být v korelaci s jiným znakem
- populace odvozené z haploidních buněk (gametofytu) zvyšují pravděpodobnost zachycení recesivních mutací, rychle lze získat homozygotní linie
- *in vitro* kultivace vysoce organizovaných rostlinných struktur (embryí, meristémů) představuje systém udržení vysoké genetické stability rostlinného materiálu, po navození regenerace je možné získávat velké množství identického potomstva (klonování *in vitro*).

Využití biotechnologických metod a principů ve šlechtění rostlin je možné rozdělit do dvou zcela odlišných oblastí:

- **techniky zachovávající původní genotyp**, umožňující krátkodobé i dlouhodobé uchovávání rostlin v kultuře *in vitro* bez významnějších genetických změn

- **techniky zvyšující genetickou variabilitu** během kultivace *in vitro*.

III.a. Techniky zachovávající původní genotyp:

a/ meristémové kultury

Meristém vhodný na založení kultury *in vitro* je struktura obsahující vlastní apikální meristém a jeden až dva páry listových primordií.

Izolované meristémy se kultivují na běžných médiích - MS (Murashige a Skoog), B (Gamborg), tekutých nebo pevných - ztužených agarem. Po přidání cytokininů do kultivačního média je potlačen inhibiční účinek apikálního vrcholu a je stimulován růst axilárních pupenů, vytváří se velké množství výhonů (*multiple shoot culture*). Výhonky se oddělují, mohou se dále klonovat. Pro zakořeňování se výhony přesazují na médium s přídatkem auxinu.

Výhodný je zejména vysoký množitelský koeficient dosahovaný tímto typem kultury - z primárního explantátu lze získat 500 000 - 1 000 000 geneticky identických rostlin. Problémy může působit převod rostlin kultivovaných *in vitro* do půdy (rostliny nemají kutikulu, mají nižší podíl palisádového parenchymu, převážně heterotrofní způsob výživy).

Epigenetické změny morfologického charakteru vzniklé v meristémové kultuře po převedení do půdy postupně vymizí. Meristémová kultura je geneticky velmi stabilní. Buňky apikálního meristému vytváří integrovaný, geneticky vysoce stabilní systém - vysoká genetická stabilita tohoto systému je zapříčiněna velmi přísnou kontrolou syntézy DNA a mitózy (neumožňující vznik endopolyploidie) a kontinuálním mitotickým dělením meristemických buněk (eliminace spontánních mutací).

Rostliny regenerované z meristémové kultury jsou fenotypově homogenní a geneticky stabilní - identické s výchozím explantátem. Frekvence mutací v potomstvu je srovnatelná s frekvencí mutací při tradičním vegetativním rozmnožování. Kromě možnosti klonování rostlin *in vitro* prostřednictvím meristémové kultury (***mikropropagace***) má z praktického hlediska značný

význam možnost eliminace virových chorob a dalších fytopatogenů při kultivaci meristémů.

b/ embryokultury

Embryokultury se rovněž vyznačují značnou genetickou stabilitou, při odvození (regeneraci) rostlin ze zygotických embryí v embryonální kultuře se neseťkáváme se změnami karyotypu - genetická kontinuita se projeví stabilním genotypem u regenerovaných rostlin, identickým s *in vitro* kultivovaným embryem.

Embryokultury lze rozdělit do 2 základních kategorií:

- kultury **semenných embryí**, jako primární explantát se používá plně vyvinuté embryo (diferencovaná bipolární struktura obsahující kořenový a stonkový meristém)
- kultury **proembryí**, za proembryo považujeme všechna stadia nezralého embrya (zárodku) do fáze diferenciacie děloh.

Zásadní rozdíl je ve způsobu výživy - semenná embrya jsou - ± autotrofní, proembrya naproti tomu heterotrofní. To se v *in vitro* kultuře projevuje různými nároky na výživu. Význam má kys. gibberelová (GA), která inicijuje růst embryonální osy a děloh, což vede k překonání dormance.

Embrya se kultivují na povrchu agarového média, nebo metodou chůvy - drobná embrya u jetelovin, trav.

Mezi hlavní oblasti aplikace embryokultur patří:

- * možnost získání hybridních embryí (zamezení aborce embryí po vzdálené hybridizaci, při postzygotické inkompatibilitě)
- * vegetativní množení - SE na nezralých i vyvinutých embryích
- * eliminace absolutní inhibice klíčení
- * zkrácení šlechtitelského procesu zkrácením nebo vyloučením období dormance.

c/ klonování in vitro

Cílem této techniky (resp. celého technologického postupu) je získání velkého počtu geneticky identických rostlin, shodných s výchozím materiálem.

Klonování v podmínkách kultur *in vitro* (mikropropagace) se může již počítat k běžným metodám klonového (vegetativního) rozmnožování rostlin.

Hlavní přednosti klonového množení rostlin *in vitro* oproti klasickým metodám jsou následující:

- * na rozmnožování se používá menší část rostliny
- * rozmnožování probíhá v axenickém prostředí, za přesně definovaných kultivačních podmínek
- * heterotrofní charakter růstu
- * podstatně rychlejší rozmnožování rostlin (množitelský koeficient dosahuje hodnot až 1:500 000 - 1:1 000 000, potenciální hodnota u některých druhů je až 1:10⁹).

Další předností je i ta skutečnost, že na klonování lze využít i takové části rostliny, které klasické vegetativní množení neumožňují, klonovat je možné v jakémkoli období či vývojové fázi, současně je zde i možnost ozdravování rostlin od patogenů.

Rozmnožování v podmínkách *in vitro* probíhá:

- - indukci axilárních meristémů při kultivaci izolovaných vrcholů (meristémové kultury)
- - adventivních meristémů a pupenů
- - diferenciací rostlin *de novo* procesem organogeneze nebo somatické embryogeneze.

Při **organogenezi** vzniká nová rostlina z několika buněk (i o různém karyologickém stavu) a existuje zde možnost vzniku chimér, mixoploidních pletiv - tento způsob regenerace zcela nezabezpečuje genetickou identitu regenerovaných rostlin.

Při regeneraci rostlin cestou **somatické embryogeneze** vzniká nová rostlina (resp. embryoid - somatické embryo, ze kterého se vyvíjí nová rostlina) z jediné buňky nebo u velmi mladých pletiv z kompaktního shluku embryogenních buněk, proembryonálního komplexu, který pravděpodobně vzniká z jediné buňky. Panuje názor, že tento způsob regenerace rostlin (SE) zabezpečuje genetickou

stabilitu. Záleží samozřejmě na podmínkách kultivace explantátu a na podmínkách navození regenerace - stabilita genotypu je zachována při přímé SE (tj. bez fáze kalusu, suspenzní, buněčné, protoplastové kultury), když embrya vznikají na mladých hypokotylech, embryích, meristému, či jiných orgánech rostlinného těla. S určitým rizikem vzniku genetické variability je možné množit rostlinný materiál cestou somatické embryogeneze v kalusových nebo suspenzních kulturách. Odchytky od původního genotypu by neměly převyšovat frekvenci, se kterou se vyskytují při tradičním množení. SE se podařila uskutečnit asi u 65 druhů rostlin, velmi záleží na typu explantátu, kultivačních podmínkách. Proces SE je silně genotypově závislý - tj. ne každý genotyp je embryogenní, např. i toto brání množení různých genotypů jednoho druhu, odrůdy.

Obecnou metodu klonování *in vitro* lze rozdělit do 5 fází:

- ◆ - příprava výchozího materiálu v optimálních podmínkách, různá fytosanitární opatření
- ◆ - izolace primárního explantátu a jeho zavedení do kultury *in vitro*, zabezpečení nekontaminovaného růstu a vývoje explantátu
- ◆ - vlastní rozmnožování - masové množení materiálu, zachování genetické stability
- ◆ - příprava regenerovaných výhonků a rostlin na přenos do půdy, ukončení tvorby axilárních výhonů, elongace výhonů (prýtů), zakořenění zvýšení intenzity světelného záření, adaptace pro přechod od heterotrofní k autotrofní výživě
- ◆ - přenos rostlin do nesterilních podmínek

Ve šlechtění rostlin se této metody zabezpečující rychlé namnožení velkého množství identického materiálu používá zejména pro rozmnožení:

- * elitních genotypů a ozdravení šlechtitelského materiálu
- * sterilních rostlin
- * haploidů, mutantů, st. rostlin získaných vzdálenou hybridizací, pylově sterilních linií

- * aneuploidů, rostlin s neobvyklou kombinací chromozómů
- * složitých hybridních genotypů, transgresních rostlin
- * u vegetativně množených rostlin lze tímto způsobem množit celý sortiment odrůd, novošlechtění i genové zdroje (zde se zejména uplatní kultivace při nízkých teplotách - 2-4°C - a slabším osvětlení, kdy dochází k omezení růstu a kultury se pasážují 1x za rok)

Významnou součástí při udržovacím šlechtění u vegetativně množených druhů (brambory, česnek, ovocné dřeviny, jahodník, okrasné rostliny, řada významných subtropických a tropických vegetativně množených plodin - banány, kasava...) je ozdravování rostlin od původců chorob pomocí meristémových kultur.

IIIb. Techniky zvyšující genetickou variabilitu:

Podle původních představ měly být kultury rostlinných explantátů *in vitro* vhodným prostředkem pro stabilní dlouhodobé rozmnožování rostlin. Tato představa se ale ukázala být ne zcela správnou - u regenerovaných rostlin se nacházely větší či menší odchylky od původního genotypu, časem se i schopnost regenerovat rostliny *in vitro* u některých typů kultur ztrácí. O genetické stabilitě rozhoduje totiž průběh morfogeneze - a geneticky stabilní systém *in vitro* je vázaný jen na organizovaný typ vývinu (tzn. při eliminaci fáze dediferenciace a kalogeneze). Tato podmínka organizovaného růstu a vývoje je splněna jen při kulturách embryí a meristémů, případně při regeneraci rostlin cestou přímé somatické embryogeneze. Variabilita v kalusových, buněčných a protoplastových kulturách se vyskytuje spontánně, nebo může být indukována. Část variability nalézané v těchto kulturách *in vitro* je geneticky podmíněná, část má charakter epigenetické variability.

a/ kalusové kultury

V povrchových vrstvách buněk explantátu se při přenosu do *in vitro* podmínek indukuje mitotické dělení. Diferencované buňky trvalých pletiv přechází do meristemického stavu - dediferencují. Vytváří se neorganizovaná hmota buněk - kalus.

Výsledkem procesu dediferenciace je vznik heterogenního systému - geneticky i morfogeneticky. Při neorganizovaném růstu dochází ke změnám buněčného cyklu - projevují se chromozómové a jaderné nestability, projevují se i změny odrážející cytogenetickou heterogenitu výchozího explantátu *in situ* (diferencovaný primární explantát obsahuje buňky i pletiva různého typu).

Protože většina rostlinných druhů je polysomatických (dif. buňky obsahují větší počet chromozómů než $2n$), je i karyologický stav buněk dediferencovaného pletiva různý. *Polysomatie = endoreduplikace provázená diferenciací, úroveň endoreduplikace může značně kolísat, není v pletivu uniformní, buňky meristemických pletiv zůstávají diploidní.*

Při indukci kalusu v kultuře *in vitro* mohou v explantátu probíhat 4 odlišné procesy (odděleně nebo se mohou různě kombinovat) - mitóza, endoreduplikace následovaná mitózou, fragmentace chromozómů (amitóza) a amplifikace DNA.

U nepolysomatických druhů (asi jen 20% rostlin - nahosemenné, mrkvovité...) je explantát uniformě euploidní, a proto je relativně vysoká pravděpodobnost zachování genetické stability v kultuře *in vitro*. U polysomatických druhů postihuje počáteční mitotická stimulace diploidní i endoreduplikované buňky a tvoří se odlišné buněčné linie, kalus je od počátku mixoploidní. Při endoreduplikaci a amitotických procesech dochází ke vzniku euploidních i aneuploidních buněk, variabilita v počtu chromozómů je velmi vysoká. Je tedy vidět, že primární kalus může obsahovat velmi heterogenní buněčnou populaci, která částečně odráží preexistující cytogenetické podmínky a částečně výsledky procesů, které probíhají během indukce kalusu.

Během *in vitro* růstu kalusových a suspenzních kultur se naskýtají dostatečné možnosti pro další cytogenetickou a genetickou variabilitu závisící na mnoha faktorech: např. na genetické konstituci druhu, hormonálním složení kultivačního média, typu kultury a kultivačním režimu. Lze pak sledovat výskyt haploidních, diploidních a polyploidních buněk. Rozsah polyploidie je někdy omezen možností indukovat mitózu u endoreduplikovaných buněk. V kultuře se mohou vyskytnout i buňky aneuploidní, dvoj- a více jaderné, vzrůstá frekvence chromozómových strukturálních změn.

Polyploidní a aneuploidní buňky, produkované *in vitro*, mohou být eliminovány nebo mohou i získávat převahu v závislosti na selekčním tlaku. Svoji roli zde hraje i doba kultivace. V průběhu dlouhodobé kultivace *in vitro* se kumulují cytologické nepravidelnosti, které mohou být příčinou snížení nebo i úplné ztráty organogenní schopnosti. S dobou kultivace kalusu *in vitro* rovněž roste podíl cytologicky odlišných rostlin, které z kultury regenerovaly, vzrůstá podíl polyploidních, chimérických a aneuploidních rostlin. Ale na druhou stranu se také někdy zdá, že rostliny jsou schopny regenerovat jen z pupenů odvozených z těch buněk, které mají počet chromozómů relativně vyvážený.

Obecně se dá vyjádřit - čím déle prochází kultura fází kalusu (resp. neorganizovaného růstu), tím větší genetická variabilita se projeví u

regenerovaných rostlin - a i když můžeme považovat všechny buňky kalusu za totipotentní, ne všechny jsou pak z morfogenetického hlediska schopné regenerovat v intaktní rostlinu.

b/ buněčné (suspenní) kultury

Tyto kultury jsou tvořeny dediferencovanými buňkami v tekutém médiu. Tento typ kultury lze založit po přenesení rozpadavého kalusu do tekutého media a jeho roztřepáváním. Kulturu tvoří drobné shluky dělících se buněk. Lze vyselektovat genotypy, které jsou embryogenní a tuto schopnost si udrží po dlouhou dobu kultivace *in vitro*. Vzhledem k tomu, že kultura nemusí být geneticky stabilní (dlouhá fáze neorganizovaného růstu) mohou se rostliny vzniklé SE od sebe odlišovat. Tohoto faktu se ale může využívat při šlechtění - rozšiřování genetické variability - vznik odlišných somaklonů, nebo přímo v systému selekce *in vitro*.

Suspenní kultury se kromě možnosti množení materiálu používají i k selekci (nebo navození mutací) na buněčné úrovni.

c/ protoplastové kultury

Protoplasty lze získávat ve velkých množstvích z různých pletiv nebo i buněčných kultur. Kultury rostlinných protoplastů lze ovlivňovat různými mutageny, jsou vypracovány metody přímého vnášení genů (cizorodé DNA) do protoplastů, zkouší se fúze protoplastů.

Protoplasty po určité době vytváří buněčnou stěnu, buňky se dělí, embryogenní genotypy mohou vytvářet som. embrya, nebo se vytváří mikrokalusy - kalusy - regenerace rostlin.

d/ kultury prašníků a mikrospor

Haploidní rostliny představují neobyčejně cenný materiál pro genetický výzkum i šlechtění. Použití haploidního materiálu umožňuje sledování segregace genů (alel) na gametické úrovni a současně dovoluje získat dokonale homozygotní rostliny už v F₁ generaci.

Frekvence výskytu spontánních haploidů je ale velmi nízká a je \pm geneticky determinovaná. Experimentální metody produkce haploidů jsou založené na ovlivnění procesů opylení a oplození fyzikálními a chemickými faktory, využívají vzdálenou hybridizaci, stimulační genotypy...

Metody *in vitro* indukce haploidů jsou následující:

- * indukovaná androgenese v prašnickových a pylových kulturách (jediný způsob, jak lze získat haploidní organismus bez účasti cytoplasmy vajíčka)
- * selektivní eliminace chromozómů v hybridním zárodku
- * indukovaná gynogeneze v neoplozených vajíčkách *in vitro*

Mikrospory (i vajíčka) kultivované *in vitro* se mohou vyvíjet dvěma způsoby - je navozena embryogeneze, nebo dochází k neorganizovanému růstu, tvorbě haploidního kalusu, ze kterého regenerují rostliny.

V prvním případě vzniká převážně haploidní potomstvo - a naopak u rostlin vzniklých nepřímou androgenézou (resp. gynogenezou) se vyskytuje značná cytogenetická variabilita, kromě haploidů regenerují diploidní, polyploidní a mixoploidní rostliny.

Schopnost regenerovat haploidní rostliny je silně geneticky závislá a je řízena pravděpodobně třístupňově:

- dědičně je řízen počet prašníků, jejichž mikrospory jsou schopny androgenese
- řízena je schopnost regenerace
- a frekvence albinózních rostlin.

U dvoudomých rostlin (např. knotovka bílá) se při regeneraci haploidních rostlin projevuje silná selekce vůči chromozómu Y - vznikají jen diploidi XX (samičci), nevzniká nadsamec - projevuje se selekce na úrovni prorůstání embryoidů. Pak je otázkou, zda-li to, co regeneruje je reprezentativním vzorkem kultury *in vitro*.

Metoda selektivní eliminace chromozómů se využívá při křížení ječmene s planým druhem *Hordeum bulbosum*. Během vývinu zárodku (během několika prvních mitotických dělení u vzniklé hybridní zygoty) dochází k eliminaci chromozómů *H. bulbosum*, haploidní rostliny se dopěstovávají *in vitro* v embryokultuře.

e/ selekce na buněčné úrovni

Jedním z nadějným směrů výzkumu v oblasti explantátových kultur je selekce žádaných genotypů v podmínkách *in vitro* - cílem je získání materiálů s geneticky podmíněnou rezistencí (proti různým patogenům, zasolení půdy, suchu, herbicidům), se stabilním projevem znaku a se současným zachováním hospodářských vlastností původního genotypu.

Selekci rezistentních rostlin lze provádět podle následujícího schématu:

- ◆ - založení buněčné kultury
- ◆ - kultivace na médiu se selekčním faktorem (toxiny, nadfyziologická koncentrace NaCl, herbicid...)
- ◆ - kultivace přežívajících buněk na standardním médiu
- ◆ - retestování rezistence kultury na selekčním médiu
- ◆ - regenerace rostlin, testy rezistence, genetická analýza
- ◆ - využití nového zdroje rezistence ve šlechtění.

Předpokladem pro uplatnění tohoto systému *in vitro* selekce je fungující regenerační systém - teprve po ověření schopnosti kultivace a regenerace z buněčné kultury je možné přistoupit k vlastnímu selekčnímu systému *in vitro*.

Selekce vojtěšky na odolnost fuzáriům, rajče - NaCl, brambor - odolné klony vůči plísni.

f/ využití somaklonální variability

Jak je tedy vidět, rostliny regenerované z kultur *in vitro* nejsou vždy geneticky a morfologicky uniformní. Genetická variabilita *in vitro*, projevující se na úrovni regenerovaných rostlin jako somaklonální variabilita, odráží jak genetickou

konstituci výchozího explantátu (genetickou mozaiku pletiv primárního explantátu), tak i možnost vzniku nových genotypů v průběhu kultivace *in vitro*.

Během kultivace *in vitro* dochází k následujícím typům změn:

- * změny v počtu chromozómů, regenerace aneuploidních rostlin, frekvence změn roste s dobou kultivace *in vitro*
- * změny struktury chromozómů, patrné při chování chromozómů v meióze, nehomologní translokace, inverze, delece
- * deamplifikace a amplifikace genů
- * genové mutace
- * změněná exprese multigenních rodin
- * mobilizace transponovatelných elementů

Míra proměnlivosti je v některých případech vyšší než variabilita rostlin M generace po aplikaci mutagenů, ačkoli v explantátové kultuře nebyly mutageny aplikovány. O mechanismech vzniku somaklonální variability a možnostech řízené kontroly se v současné době ví jen málo, ale je zřejmé, že vznik somaklonální variability je spojen s neorganizovaným růstem *in vitro*.

Možné příčiny vzniku somaklonální variability jsou:

- * existence genetických změn v buňkách diferencovaných pletiv intaktních rostlin
- * karyologické změny v *in vitro* kultuře
- * mutace major a minor genů v *in vitro* kultuře
- * změny regulace exprese genů, transpozómy, mitotický crossing-over

Geneticky nestabilní jsou kalusové, buněčné a protoplastové kultury a v některých případech rostliny z nich regenerované. Pokud kultura projde fází kalusu, vzrůstá cytogenetická variabilita. Tyto kultury jsou pak rezervoáry rozsáhlé variability, jejíž projev závisí ještě na mnoha faktorech.

Naopak kultury intaktních orgánů, vyznačujících se růstem organizovaným struktur (meristémů, embryí), jsou do značné míry geneticky stabilní a rostliny z

nich regenerované mají charakter klonu (geneticky uniformního potomstva). Tyto dva různé systémy stability, resp. variability, poskytují významné možnosti pro současné šlechtitelské biotechnologie.

IV. Kryoprezervace rostlinného materiálu.

V posledních letech se začíná karyologický přístup uplatňovat i při **dlouhodobém uchovávání rostlinného materiálu** - kryokonzervační postupy se kromě semen využívají i při uskladňování (uchovávání) zygotických a somatických embryí, prašníků, pylu, vzrostných vrcholů, meristémů, pupenů, buněčných a kalusových kultur, protoplastů.

Základem úspěšnosti kryokonzervace (kryoprezervace) je poznání fyzikálně - chemických procesů, které probíhají v buňkách v průběhu **ochlazování, zmrazování a rozmrazování**, protože samotné uchovávání biologických objektů při teplotě kapalného dusíku ($\text{LN}_2 = -196^\circ\text{C}$) nemá podstatný vliv na celistvost buněk.

Při ochlazování z fyziologických teplot na teplotu LN_2 se buňky zmrazují jedním z následujících způsobů:

- extracelulární zmrazování - pomalé ochlazování, volná voda přechází z vnitrobuněčného do mezibuněčného prostoru, vznikají extracelulární krystaly ledu a uvnitř dehydrovaných buněk se krystaly netvoří
- intracelulární zmrazování - buňky se ochlazují takovou rychlostí, že voda z nich nevystupuje dostatečně rychle, krystaly vznikají uvnitř i mimo buňky
- vitifikace - vysoká rychlost ochlazování, až 10 C/s a intracelulární voda tuhne bez vytvoření krystalů

Rostlinné buňky mají v porovnání se živočišnými nebo mikrobiálními specifické znaky a vlastnosti (vysoká morfologická variabilita, silná vakuolizace + vysoký obsah vody, velký rozsah a plastičnost membrán) - a vhodný kryokonzervační postup se musí určovat empiricky.

Při kryoprezervaci rostlinných buněk je zpravidla nutné dodržet úplný postup, který zohledňuje:

- * - výběr materiálu
- * - prekulivace
- * - kryoprotekce
- * - způsob a režim ochlazování
- * - uchovávání v LN₂
- * - režim rozmrazování

Volba materiálu - odolnost negativním vlivům ochlazování, která je závislá na morfofunkčním stavu buněk. Vhodné jsou tenkostěnné meristematické buňky s vysokou mitotickou aktivitou a nízkou vakuolizací (apikální meristém, buněčná suspenze od konce lag fáze po střed exponenciální fáze růstu).

Fyziologický význam **prekulivace** spočívá v iniciaci takových morfologických a fyziologických změn, které zvyšují mrazovou toleranci buněk - chladová adaptace buněk, použití osmoticky aktivních látek (sacharóza), aplikace aminokyselin (prolinu), použití kryoprotektiv (DMSO), růstových regulátorů (ABA, GA3).

Ochranný účinek **kryoprotektiv** (alkoholy, amidy, oxidy, cukry, chloridy, aminokyseliny, acetáty, umělé polymery... - penetrující nebo nepenetrující do buněk) má za následek redukci tvorby a rychlosti růstu ledových krystalů, vázání volné vody, zvýšení permeability membrán, osmotickou dehydrataci, zpomalení enzymatické kinetiky Doba ekvibrace bývá do 60 min.

Volba **režimu ochlazování** závisí na použitém rostlinném materiálu. Pomalé ochlazování - rychlost do 10 C/min - u buněčných a kalusových kultur, somatických embryí, meristémů, semena s obsahem vody nad 30 %. Rychlé zmrazování - 10 C/min - se používá u semen s obsahem vody do 15 %, meristémů, vzrostných vrcholů, somatických a zygotických embryí.

Uchovávání rostlinného materiálu v LN₂ předpokládá zastavení metabolických procesů a uchování genetické stability. Tyto požadavky splňuje uchovávání v kapalném dusíku (-196°C) nebo v parách dusíku (-120 - -150°C). Délka uchovávání neovlivňuje viabilitu buněk.

Úspěšné **rozmrazování** buněk předpokládá takovou rychlost ohřívání, která eliminuje rekrystalizaci vnitrobuněčného ledu a další dehydrataci buněk. Nejčastějším způsobem rozmrazování je rychlé rozmrazení ponořením do vodní lázně o teplotě 34 – 40°C, používá se i pomalé ohřívání - např. u kalusových kultur.

Dlouhodobá kryokonzervace rostlinného materiálu musí splňovat dvě základní podmínky:

- - vysokou viabilitu buněk bez přítomnosti selekčního tlaku
- - absenci genetických změn a zachování kvalitativních vlastností zárodečné plazmy.

Objektivním určením viability buněk po kryokonzervaci je **obnovení** jejich **růstu** charakterizované obnovou normálních metabolických funkcí. Obnovení růstu zpravidla nastává po několikadenní až několikaměsíční lag fázi, během které pravděpodobně dochází k reparaci buněčných poškození.

Pro okamžité stanovení viability buněk je možné použít některých testů - vitální barvení, aktivita enzymů...

Genetické změny v důsledku kryokonzervace se u rostlinných buněk nesledovaly (ale např. v živočišných buňkách může dojít k fragmentaci jader, vzniku chromozómových zlomů, výskytu aneuploidie).

Z praktického hlediska spočívá hlavní význam kryokonzervace v uchování cenných genetických zdrojů ve formě semen nebo i částí vegetativních orgánů.

V. Imobilizace buněk a enzymů.

Použití imobilizovaných enzymů v potravinářském, farmaceutickém a chemickém průmyslu se výrazně zvýšilo v posledním desetiletí. Další výzkum a vývoj v enzymové technologii předpokládá jejich využití v syntéze chirálních drog (léků), komplexních organických sloučenin a „jemných“ chemikálií/biochemikálií a směřuje ke konstrukci nových, specifických biosenzorů.

Enzymy ve své nativní (přirozené) formě se již po staletí používají v potravinářství a v poslední době nacházejí aplikace i ve farmaceutickém a chemickém průmyslu. Jejich struktura a mechanismus enzymatické činnosti je objasňován precizními experimentálními metodami - jako je např. klasická X-ray technika nebo moderní metoda NMR (nukleární magnetické rezonance). Moderní metody genového inženýrství umožnily získávat enzymy ve velkém množství a modifikovat jejich primární strukturu, a tak i měnit jejich fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti. Enzymů se pro použití v potravinářství, jako detergentů, ve speciálním chemickém a diagnostickém průmyslu prodalo v roce 1992 za více než 700 mil. USD. Navíc v okamžiku až proteinové/enzymové inženýrství začne produkovat nejen klasické, relativně levné enzymy (proteázy, amylázy, pektinázy a lipázy), ale i více komplexní enzymy v přijatelné ceně, lze očekávat nárůst nových, na enzymech založených procesů a i obrat na „enzymovém trhu“.

Zvyšující se použití imobilizovaných enzymů se těší zvláštnímu zájmu. Termín „imobilizovaný enzym“ byl použit v souladu s doporučením první „Enzyme Engineering Conference“ v roce 1971 (New Hampshire, USA) k označení „enzymů fyzikálně omezených nebo lokalizovaných v určité definované oblasti s retencí jejich katalytických aktivit, a které mohou být použity opakovaně a kontinuálně“.

Metoda imobilizace enzymů se využívá již déle - min. od počátku 60. let - zpočátku spíše pro výzkumné účely, pro objasnění mechanismů enzymatické činnosti enzymů vázaných v přirozených biologických membránách. Do nerozpustných nosičů imobilizované nebo na umělé membrány vázané běžné

proteolytické enzymy (trypsin, papain), byly používány k výzkumu jejich stability, aktivity.

Uměle imobilizované enzymy, pokud jsou stabilní, mohou být využity ke konstrukci bioreaktorů a opakovaně využívány v kontinuálních procesech, které pak mohou být jednodušeji řízeny.

| Imobilizace biokatalyzátorů - možné výhody a nevýhody: | |
|---|--|
| • Možné výhody: | jednodušší provoz a kontrola bioreaktoru jednodušší získávání (izolace) a čištění (purifikace) produktu širší výběr reaktorů |
| • Možné nevýhody: | ztráta aktivity snížení aktivity na jednotku objemu difusní limitace další náklady |

První průmyslové použití imobilizovaných enzymů bylo publikováno v roce 1967 (firemní výzkum v Japonsku - Tanake Seiyaku Co.). Týkalo se vývoje kolony s imobilizovanou *aminoacylázou* z *Aspergillus oryzae* pro rozlišení syntetických, racemických DL-aminokyselin na opticky aktivní enantiomery. Kolem r. 1970 byly zavedeny další dva imobilizované systémy do velkokapacitní produkce - v Anglii *penicillin acyláza* (také nazývaná *penicillin amidáza*) využívaná pro přípravu *6-amino penicillanic acid* z penicilinu G nebo V a v USA *glukózo isomeráza* pro konverzi glukózy na fruktózu.

Tyto úspěšné průmyslové aplikace zahájily velice intenzivní výzkum v enzymové technologii, vedoucí k neustále se zvyšujícímu počtu průmyslových procesů založených na složitých reaktorech s imobilizovanými enzymy.

U některých nových průmyslových procesů jsou celé mikrobiální buňky, obsahující relativně velké množství požadovaného enzymu, imobilizovány a použity jako pevný katalyzátor se všemi výhodami imobilizovaných enzymů. Tento

proces je používán pro reakce katalyzované intracelulárními enzymy. Technika imobilizace v tomto případě -nahraňuje zdlouhavé a nákladné purifikační metody, které mnohdy mají za následek malý výtěžek enzymu a jeho nízkou stabilitu.

| Světová produkce některých produktů potravinářského, farmaceutického a chemického průmyslu získaná použitím imobilizovaných enzymů (1992): | | | |
|---|---------------------|--------------------|---------------------|
| <i>produkt</i> | <i>substrát</i> | <i>enzym</i> | <i>produkce (t)</i> |
| HFCS | glukóza (ze škrobu) | glukóza isomeráza | 8.000.000 |
| 6-APA | penicilin G - V | penicillin amidáza | 7500 |
| acrylamid | acrylonitril | nitril hydratáza | 15000 |

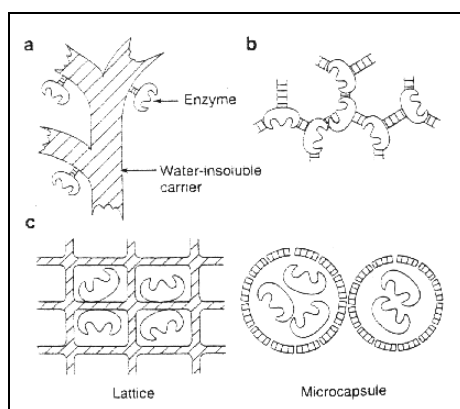
HFCS - kukuřičný sirup s vysokým obsahem fruktózy

6-APA - 6-amino penicillanic acid

Techniky imobilizace enzymů

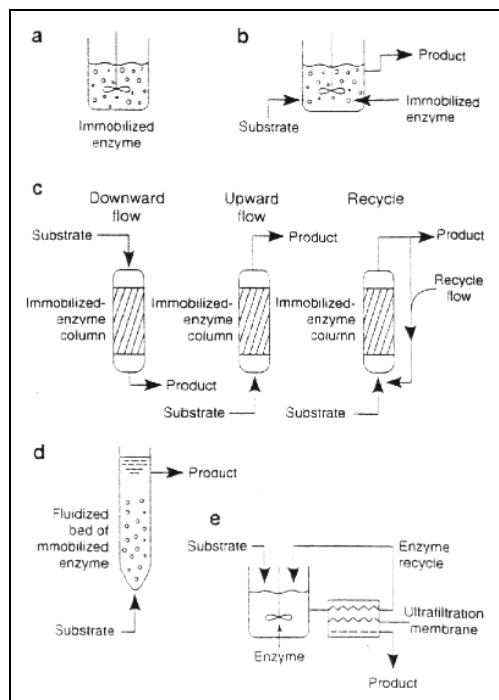
Enzymy mohou být imobilizovány za použití celé řady technik:

- kovalentní navázání enzymu na nosič, vč. tzv. enzymových krystalů (cross-linked enzyme crystal)
- konjugáty enzym-nosič, kde je enzym adsorbován nebo kovalentně vázán na nosič
- preparáty, kde enzym je zachycený v gelu, vláknech nebo mikrokapsulích
- systémy, ve kterých enzym zůstává v roztoku, ale „pracuje“ v limitovaném prostoru uzavřeném ultrafiltrační membránou nebo vlákny.



Reaktory využívající imobilizované enzymy

Imobilizované enzymy jsou obecně docela stabilní a jsou často mnohem stabilnější než jejich nativní analogy. Toto zjištění vedlo bioinženýry ke konstrukci enzymových reaktorů které mohou být uzpůsobené k provádění partikulární chemické reakce. Enzymové reaktory zahrnují vsádkové reaktory s míchacím tankem, různé typy kontinuálních reaktorů.



Reaktory s imobilizovanými enzymy skýtají výhody jakou je např. vysoká dávka enzymu, prodloužená doba enzymové aktivity, schopnost recyklace produktů, vysoký průtok, redukce nákladů, energie a odpadních produktů, jednoduchý přechod na velkokapacitní kultivaci/produkci, vysoký výtěžek čistého materiálu (produktu).

Automatizace těchto procesů vede k výraznému snížení nákladů - např. při optickém rozlišování racemických aminokyselin použitím amino acylázy použití imobilizovaného systému vede ke 40% snížení nákladů ve srovnání s konvenčním vsádkovým procesem při použití roztoku enzymu (enzymu v roztoku). Úspory jsou zejména v potřebě enzymu a práce, a ve zvýšení výtěžku produktu v důsledku jednoduché izolace L-aminokyselin z reakční směsi.

Imobilizované enzymy v potravinářském, farmaceutickém a chemickém průmyslu

Celá řada enzymů je používána v potravinářství při zpracování škrobu, výrobě sýrů, konzervaci potravin, hydrolýze lipidů - více než polovina objemu komerčně využívaných enzymů připadá na potravinářství.

Farmaceutický průmysl rovněž úspěšně využívá řady imobilizovaných enzymových systémů, chemický průmysl (těžký) odmítal využití biokatalyzátorů, nyní již úspěšně používá některé biotechnologické procesy využívající imobilizované enzymy.

Příklady využití imobilizovaných enzymových systémů:

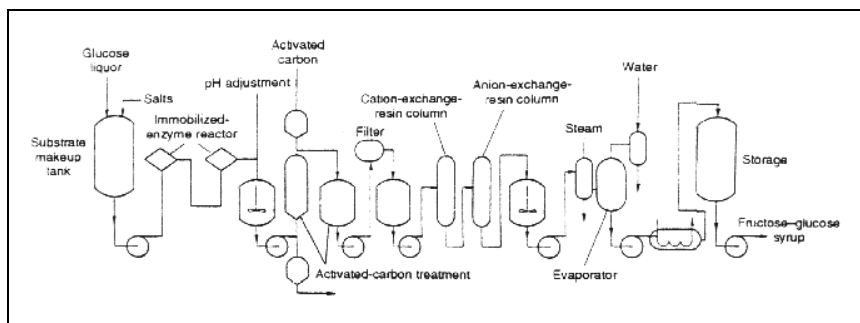
- ***imobilizovaná glukózo isomeráza při produkci sirupu obohaceného fruktózou***

Enzym *glukózo isomeráza* katalyzuje transformaci glukózy na fruktózu. Protože fruktóza je sladší než glukóza a rovnovážný stav je dosažen při přibližně ekvimolárním zastoupení obou cukrů, je výsledný produkt je sladší než glukóza.

Produkce kukuřičného sirupu, obohaceného fruktózou, ze škrobu zahrnuje 3 enzymaticky katalyzované fáze:

- „zkapalnění“ škrobu *α -amylázou*
- sacharifikaci *glukoamylázou*
- izomeraci glukózy *glukózo izomerázou*

První kontinuální izomerační proces byl zaveden v roce 1970 v Clinton Corn Processing Company, USA. Toto „nové“ sladidlo slouží zejména k substituci sacharózy v nápojích Coca-Cola a Pepsi-Cola, cukroví... Roční produkce cca 8 mil tun demonstruje význam dobře vybraného imobilizovaného biokatalyzátoru determinujícího úspěch důležitého průmyslově - chemického procesu.



- **imobilizovaná laktáza při hydrolýze laktózy v mléce**

laktáza (β -galaktosidáza) štěpí laktózu na její monosacharidové komponenty, glukózu a galaktózu. Lidé trpící deficiencí laktázy, onemocní, pokud pijí mléko, které obsahuje 4.3-4.5% laktózy. Problému lze předejít enzymatickou hydrolýzou laktózy před konzumací mléka.

Speciální reaktory s imobilizovanou β -galaktosidázou pro kontinuální hydrolýzu laktózy v mléčných výrobcích byly vyvinuty SNAM Progetti (I) a Sumitomo Chemiclax (Jap).

Laktóza má tendenci krystalizovat při nízkých teplotách. Její krystalizaci v mražených krémech a zmrzlínách lze předejít ošetřením mléka imobilizovanou β -galaktosidázou.

- **rafinace tuků a olejů**

Specifická lipáza katalyzuje transformaci palmového oleje na „náhražky“ kakaového másla. Čokoláda obsahuje cca 30% kakaového másla, tržní využití tohoto produktu je pak potenciálně velmi vysoká. Palmový olej může být pozměněn nahrazením palmitových zbytků v 1- a 3- pozici triglyceridů palmového oleje

stearovými skupinami. Dostupnost 1,3-specifické *lipázy*, schopné reakce v organických rozpouštědlech, v případě její adsorbce na imobilizovaný nosič, dělá tento proces zvláště atraktivním pro enzymovou technologii.

- **enzymatická syntéza aspartamu**

Aspartam - (L-aspartyl-L-phenylalanin methyl ester) je „umělé“ sladidlo - dipeptid, poprvé objevený v roce 1965. Jako náhražka cukru se více začíná používat v posledních letech. Je syntetizován chemicky, ale v poslední době byl vyvinut enzymatický proces syntézy aspartamu. Imobilizovaný *thermolysin* byl použit jako biokatalyzátor při tomto postupu (*N*-(benzyloxycarbonyl)-L-aspartát a phenylalanin methyl ester jsou enzymaticky sloučeny na ethylacetát, produkt je ošetřen kyselinou a získává se aspartam).

- **produkce 6-amino penicillanic kyseliny imobilizovanou penicillin amidázou**

β -lactamová antibiotika (penicilíny a cephalosporiny) jsou dnes nejpoužívanější antibiotika. Různá semisyntetická β -lactamová antibiotika jsou syntetizována za účelem získání efektivních účinných derivátů pro orální použití. Např. ampicilin a amoxicilin jsou připravovány acylací 6-aminopenicillanic kyseliny (6-APA) odvozené z penicilinu G nebo V, cephalosporiny jsou získávány acylací 7-amino-cephalosporanic kyseliny (7-ACA) nebo 7-amino-desacetoxycephalosporanic kyseliny (7-ADCA). Produkce 6-APA dosahuje asi 7500 tun ročně - deacylací nativních penicilinů imobilizovanou penicillin amidázou z *Escherichia coli* nebo *Bacillus megaterium*.

- **stereochemické rozlišení racemických aminokyselin imobilizovanou aminoacylázou**

Opticky aktivní L-aminokyseliny mohou být získány z jim odpovídajících, chemicky syntetizovaných DL forem při použití enzymatického procesu. DL-aminokyseliny jsou transformovány na acyl-DL aminokyseliny, které jsou ošetřeny imobilizovanou aminoacylázou k získání opticky aktivní L-aminokyseliny a intaktní acyl-D-amino kyseliny. D-antipod může být racemizován a proces lze opakovat.

Průmyslový enzymový reaktor, ve kterém imobilizovaná *aminoacyláza* připravená ionickým navázáním *aminoacylázy* z *Aspergillus oryzae* na DEAE-Sephadex byl poprvé popsán v roce 1967. Tanabe Seiyaku Company (Jap) produkuje imobilizovaný enzym - v kolonách o objemu 1000 l - každá kolona dává měsíční výtěžek 5-20 tun L-methioninu, L-phenylalaninu nebo L-valinu.

Další L-aminokyseliny jsou získávány následujícími postupy: L-alanin je získáván z L-asparagové kyseliny - pomocí *L-aspartát- β -dekarboxylázy* z imobilizovaných mikrobiálních buněk, L-tryptofan je získáván z indolu, kys. pyrohroznové a čpavku pomocí *L-tryptophanázy*.

- **enzymatická produkce L-asparagové kyseliny a L-jablečné kyseliny**

Obě kyseliny jsou v Japonsku produkovány z kys. fumarové za použití vhodných imobilizovaných enzymů. Imobilizovaná *aspartáza* z *E. coli* katalyzuje interakci kys. fumarové a čpavku - produktem je kys. L-asparagová, imobilizovaná *fumaráza* z *Brevibacterium flavum* je používána k transformaci kys. fumarové na kys. jablečnou. Stabilita obou intracelulárních enzymů je prokazatelně zvýšena, když inaktivované mikrobiální buňky obsahující enzym jsou zachyceny/imobilizovány v k-carrageenanu. Reakce opět probíhají na velkokapacitních kolonách o objemu 1000 l.

Kyselina L-jablečná je široce používána jako potravinářské aditivum do ovocných a zeleninových džusů, limonád, marmelád a cukroví.

- **enzymatická syntéza akrylamidu**

Akrylamid je používán jako výchozí surovina pro produkci různých polymerů. Může být vyráběn chemicky reakcí acetonitrilu s vodou v přítomnosti vhodného katalyzátoru. Ale vzhledem k problémům s měděným katalyzátorem a výskytu vedlejších reakcí, byl chemický proces nahrazen enzymatickým. Bylo zjištěno, že *Rhodococcus rhodochrous J1* (organismus bohatý na *nitril hydratázu* (NHázu), může transformovat acrylonitril na akrylamid se 100% konverzí substrátu a výtěžkem 656g akrylamidu na 1 l reakční směsi. V průmyslovém procesu jsou buňky *R. rhodochrous* imobilizovány v polyakrylamidovém gelu, umožňujícím opakované použití.

- **biosenzory**

Biosenzory představují speciální skupinu senzorů, které se skládají z biologické citlivé vrstvy, obsahující receptor, protilátku (antibody) nebo enzym - těsně spojené se zařízením (transduktor), schopným poskytovat informaci a o složení okolního prostředí. Emitovaný signál (elektrochemický, optický nebo termální) je vysílán do vhodně kalibrovaného přijímače. V posledních letech byl udělán významný pokrok v této oblasti, v oblasti designu a konstrukci biosenzorů.

Příklady použití imobilizovaných enzymů pro potravinářské aplikace:

- - *invertáza* imobilizovaná na magnetický silica nosič pro konverzi sacharózy na monosacharidy
- - imobilizovaná *lipáza* pro substituci oleje jojoby z řepkového oleje
- imobilizovaná *glukózo izomeráza* pro produkci fruktózy z glukózy
- imobilizovaná *lipáza* pro kontinuální produkci *fruktose oleate*
- použití *thiol proteázy* (imobilizované na polymethacrylátu a používané v organickém rozpouštědle) pro produkci syntetického dipeptidu - sladidla
- proteáza pro zlepšení zrání sýrů
- imobilizovaná *endo-β-glukosidáza* pro aromatické látky - zlepšení vína a ovocných šťáv
- enzymy imobilizované na keramických filtrech - produkce frukto-oligosacharidů (umělá sladidla)
- bioreaktor obsahující imobilizovaný *pepsin* a *kyselou proteázu* pro produkci hydrolyzátu z pšeničného proteinu
- imobilizované enzymové biosenzory pro určení čerstvosti ryb a masa

| Biotransformace pro produkci přísad | | |
|--|---|--|
| vonná látka | chuť | mikroorganismus/enzym |
| methyketony | mléčná | <i>Penicillium roquefortii</i> |
| γ -decalacton | ovocná, zejména brosková; mléčná | kvasinky, β -oxidace a lipázy |
| Δ -lacton | různé | kvasinky, β -oxidace a lipázy |
| diacetyl | mléčná | <i>Streptococcus diacetylactis</i> |
| 1-octen-3-ol | houbová | homogenizované houby |
| <i>cis</i> -3-hexen-1-ol/ <i>cis</i> -3-hexen-1- al | ovocná a zeleninová, „čerstvá chuť“ | rostlinné lipoxigenase hydro- peroxide lyázy a dehydrogenázy |
| masové hydrolyzáty | druhově specifické masové chutě | proteázy |
| benzaldehyd | třešňová a mandlová | β -glukosidázy a nitril lyázy |
| Aspartam® | vysoce intenzivní sladidlo | metoloproteázy (thermolysin) |
| enzymaticky modifikované sýry | sýrová (různé typy) | lipázy a proteázy |
| estery | různé, včetně ovocné | lipázy a proteázy |
| methylnáselné kyseliny | (pro esterifikaci) | <i>Acetobacter acetii-</i> dehydrogenázy |
| ethylestery (např. ethylisovalerát) | různé | <i>Geotrichum fragrans</i> , ox.deamin. |
| methylantranilát | hroznová (vinná) | <i>Polyporus versicolor</i> |
| 2-fenylethanol | ovocná (nápojová) | kvasinky, deaminázy, dekarboxylázy, reduktázy |
| Furaneol® | ovocná, zejména jahodová | rhamnosidázy |
| degradace naringinu | odstraňování hořkosti citrusů, zejména pomerančů | naringinázy |
| limonin/degradace limonoatu | odstraňování hořkosti citrusů, zejména grepů | <i>Arthrobacter globiformis</i> , limonoát dehydrogenáza |
| diallylthiosulfonát | česneková | alliinázy |
| isothiokyanáty | hořčičná | myrosináza |
| monosodium glutamát | zvýrazňovač | <i>Corynebacterium glutamicum</i> |
| guanosin monofosfát | zvýrazňovač | <i>Penicillium citrinum</i> , fosfodiester. |
| inosin monofosfát | zvýrazňovač | <i>Brevibacterium ammoniagenes</i> , adenyldeamináza |

Oblasti dalšího rozvoje v oblasti imobilizace enzymů:

- modifikace a velkoobjemová produkce enzymů produkovaných (upravených) metodami GI
- izolace, charakterizování a průmyslové využití enzymů z termofilních nebo halofytních mikroorganismů
- syntéza chirálních drog - enantiomery chirálních drog (léků) mohou vykazovat výrazné odlišnosti v biologické aktivitě, toxicitě, metabolismu. Více než 500 syntetických drog je prodáváno jako racemické směsi a je jen velmi málo známo o vlastnostech jejich stereoisomerů.
- procesy dovolující enzymaticky katalyzované reakce v nevodném prostředí. Objev, že enzymy jako oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy a isomerázy mohou fungovat v apolárních rozpouštědlech (toluen, benzen, hexan, cyklohexan) rozšířil rozsah reakcí které mohou být docilovány pomocí biokatalýzy - např. oxidace steroidů, epoxidace, hydroxylace, fenolická polymerace, syntéza esterů a peptidů, rozlišování racemických směsí.
- regenerace koenzymů - řada známých enzymů zapojených do oxidoredukčních reakcí a přenosu specifických atomů nebo funkčních skupin vyžaduje koenzymy (NAD(H), NADP(H), FAD(H₂), ATP, ADP). Tyto koenzymy jsou ale labilní a drahé a ekonomické využití těchto enzymových systémů závisí pak na úspěšné regeneraci koenzymů.
- ošetřování odpadních vod - zejména při kontaminaci vody jedním nebo několika známými kontaminanty , které mohou být specificky modifikovány nebo eliminovány enzymatickou cestou

VI. Regulace biotechnologií.

Regulacemi biotechnologií se ve většině případů myslí určitá regulace „produktů“ GI - tj. regulace podmínek, za kterých dochází k transformaci genetické informace, a regulace další manipulace s modifikovanými organismy.

Je velká obava, aby organismus, který má metodami molekulární biologie, metodami rekombinantní DNA modifikovanou genetickou informaci nemohl negativně ovlivnit okolní prostředí; aby nedošlo k jeho nekontrolovatelnému šíření, protože tato nová vlastnost (resp. umělý zásah do genomu a změna regulačních vazeb) může vyvolat např. patogenitu mikroorganismu používaného jako vektoru, či prostředku ke klonování.

Dále je tu určitá možnost „úniku genů do prostředí“ - u rostlin s nějakou novou vlastností (rezistence herbicidům, škůdcům) může dojít k cizosprašení s plevelnými příbuznými druhy a přenesení této vlastnosti do plevelů.

V dubnu 1990 EC (evropská komise) přijala 2 direktivy o biotechnologiích:

- **direktiva 90/219 - o uzavřeném používání GMO (angl.)**
- **direktiva 90/220 - o uvážlivém vypouštění GMO do prostředí n()**

Do roku 1991 měly státy EC začlenit tyto direktivy do svých národních zákonů, direktivy jsou poměrně flexibilní a dovolují různý výklad a na ten působí i rozdílné národní zákony a politická situace.

Obě direktivy požadují ustavení kompetentních orgánů - oficiálních státních orgánů, které vydávají licence, provádějí inspekce... Situace ve skutečnosti je ale velmi složitá a odlišná v členských státech EC.

Relativně přísná opatření - technická - pro laboratoře pracující s rekombinantní DNA, omezení kultivace transgenních rostlin, licence a zvláštní regulace polních pokusů s GMO, testování možnosti přenosu genů - sprášení, izolační vzdálenosti, škodlivost pro člověka, příp. další konzumenty.

Co regulovat ? - direktivy definují co je a co není GMO - z „uzavřeného“ používání jsou vyloučeny hybridoma cells, mikroorganismy skupiny 1, mutageneze, fúze buněk (kde výsledek může být produkován i tradičními

šlechtitelskými metodami), ale např. U.K. reguluje produkci rostlin vzniklých fúzí.. Lze jen konstatovat, že situace v Evropě stále není vyladěná, ale že se pracuje na dalším sjednocení i v této oblasti..

SRN, Irsko - testy pustily po 1 výstupu, DK, I - 2, E - 3.

Duben 1994 - UK povolení transgenní řepky, po testech JI–Cambr.

Byla vyslovena i zajímavá otázka, zda se geneticky modifikovaný organismus nemůže stát plevelem, tj. že může dojít k mutacím a objevení se plevelných vlastností. Většina těchto vlastností, které dělají plevele pleveli (široké spektrum podmínek, kde jsou schopny vyklíčit a vyrůst, tvrdosemennost - ne všechno vyklíčí najednou, dlouhá životnost semen, rychlý růst, So, velká produkce semen, snadné šíření semen, u trvalých snadné vegetativní rozmnožování - z fragmentů, dobří konkurenti, ekotypy, polyploidie) jsou jednoduše geneticky řízeny a je jen velmi malá naděje, že by došlo ke kumulaci alel se znaky „plevelnosti“. Byla prováděna docela zajímavá srovnání - plevelné druhy mají 10 - 11 těchto charakteristik, neplevelné 7, kulturní plodiny 5. Pravděpodobnost nějakého zvrhnutí je 10 - u kukuřice se pěstuje 18 biliónů rostlin a i tady není výskyt moc pravděpodobný (hlavně proto, že osivo stále za kontrolovatelných podmínek dodává šlechtitel a množitel).

zařadit - Etické, právní ... problémy biotechnologií

VII. Využití kultur rostlinných explantátů *in vitro* u obilovin.

Obiloviny - jednoděložné rostliny, složité z hlediska metod kultivace *in vitro*, transformace, pokrok až v posledním období.

Obecné schéma *in vitro* kultur u obilovin

Pšenice: nejdůležitější plodina, složitý původ (amfialotetraploid - původ má ve spontánní mezirodové hybridizaci).

Vzhledem ke způsobu rozmnožování je nejrozšířenější metodou šlechtění pšenice křížení s následným výběrem. Zejména při rezistentním šlechtění se pak využívá zpětné křížení. Těmito „klasickými“ metodami se dosahuje značných úspěchů ve šlechtění, ale je i obava, že poměrně úzký genetický základ intenzivních odrůd by mohl negativně ovlivnit další vývoj ve šlechtění.

Značný rozvoj biotechnologických metod v posledním období vede i přes značné obtíže k jejich širšímu uplatňování u obilovin.

V současnosti jsou propracovány metody kultivace orgánů, pletiv a i buněk zaměřené na **produkcí homozygotního materiálu** (náhrada několika generací samosprašování - urychlení šlechtitelského procesu) nebo na **zvyšování genetické variability** (rozšíření genetického základu pro možnost výběru).

Získávání haploidních rostlin

- frekvence výskytu spontánních haploidů je velmi nízká (1.10⁻⁶ - 1.10⁻⁸) a u pšenice jsou vypracovány 2 metody produkce haploidních rostlin:

- a/- indukce tvorby haploidů v pylových a prašниковých kulturách (androgenese *in vitro*) - v *in vitro* kultuře prašníků nebo izolovaných mikrospor dochází k indukci embryoidů nebo kalusů (asi po 4 týdnech kultivace) a z nich probíhá regenerace rostlin □ kolchicinace □ získání diploidních homozygotních linií.

Přes všechny obtíže spojené s indukcí haploidních rostlin je to asi nejlepší metoda získávání homozygotních materiálů pro další šlechtění.

Produkcí haploidních rostlin ovlivňuje obrovská řada faktorů - zejména genotyp rostlin, podmínky pěstování donorových rostlin (z nichž se odebírají prašníky), předpůsobení chladem (zvýšení frekvence tvorby haploidů), fáze vývoje mikrospor (střední až pozdní jednobuněčná fáze), kultivační médium (cukry, růstové regulátory, AK), podmínky kultivace. Celý proces androgenese je velmi silně genotypově závislý a také velký počet různých faktorů ukazuje na jeho složitost.

- b/- produkce haploidních rostlin po křížení s *Hordeum bulbosum* tato metoda má využití nejen při získávání haploidních rostlin u ječmene, ale i u pšenice. Při křížení s tímto planým druhem dochází ke vzniku hybridní zygoty a během několika prvních dělení dochází k eliminaci chromozómů *H. bulbosum*. Haploidní embrya abortují. Proto se k jejich dopěstování využívá embryokultur. Po křížení se izolují nezralá embrya (10-14 dní stará) a dopěstují se v *in vitro* kultuře. Získané haploidní rostliny se diploidizují kolchicinem.

Při porovnání obou metod je vidět přibližně stejná účinnost obou postupů získávání haploidů - a následně diploidních rostlin.. Nicméně při metodě androgenese *in vitro* je příznivější menší pracnost, další optimalizací kultivačních podmínek bude asi možné získávat větší množství regenerovaných rostlin.

Kalusové kultury a somatická embryogeneze

kalus, kalusové kultury schopné regenerace rostlin, byly odvozeny z nezralých embryí, zralých zrn, klíčnicích rostlin a květenství. SE byla indukována v kalusové kultuře - kalus měl původ ve štítku nezralých embryí

Regenerace ze suspenzních kultur je velmi řídká. Také byly odvozeny **kultury protoplastů** - ale zatím se nedaří regenerovat celé rostliny. Buňky diferencovaných pletiv, z nichž byly izolovány protoplasty, zcela ztrácí totipotenci, nejsou schopné regenerace.

Využití kultur *in vitro* při vzdálené hybridizaci

- při použití kultur embryí je možné získat hybridní rostliny mající původ v křížení taxonomicky vzdálených rodičovských komponent - praktický význam má zejména možnost produkce rostlin *Triticale*. Kromě kultivace embryí je i možnost regenerace přes hybridní endosperm □ kalus □□regenerant.

Schéma využití kultur *in vitro* u pšenice:

VIII. Využití kultur rostlinných explantátů u olejnin.

Využití metod *in vitro* ve šlechtění řepky

Řepka olejná je naší nejdůležitější olejinou, tento druh (resp. taxon, který se pěstuje jako olejnina - *Brassica napus* subsp. *napus*) je spontánním amfidiploidem, vzniklým na základě vzdálené hybridizace *B. oleracea* a *B. campestris* (*B. rapa oleifera*).

Šlechtění řepky je zaměřeno na otázku kvality (00, 0 řepky - tj. změna skladby mastných kyselin, bez glukosinulátů), zvyšování výnosů semene a oleje, rezistence, zvýšení podílů tuků a bílkovin v semeni, a dále na šlechtění řepky pro technické účely (kys. eruková, olejová, ... oleochemie).

Hlavní šlechtitelskou metodou je kombinační křížení a získání značně široké genetické variability - výběry, hodnocení...

Nové 00 řepky mají většinou základ v liniovém šlechtění, tím dochází ale mnohdy k zúžení genetické základny odrůd a značná část výkonných odrůd je si dosti podobných.

Heterozní šlechtění - výzkum se soustřeďuje na získání vhodných systémů řízeného opylení - CMS, AI.

Na získání genotypů s nízkým (nebo nulovým) obsahem glukosinulátů se využívá křížení s odrůdou „Bronowski“ nebo vzdálené hybridizace a tvorba syntetické *B.napus*.

Z hlediska biologie kvetení patří *B.napus* k cizosprašným druhům, u současných odrůd ale většinou již převažuje podíl samosprašných typů. Nicméně jistou cizosprašnost a tím i přítomnost „různých“ genotypů je třeba mít na zřeteli i při odvozování tkánové kultury - protože mnohé jevy *in vitro* jsou genotypově podmíněné a ne všechny genotypy dané odrůdy reagují stejně.

Vzhledem k biologii rostliny, AI, určitému podílu cizosprašnosti, obtížně geneticky založené rezistenci vůči chorobám ..., problematické možnosti přenosu

CMS lze mnohé cíle jen velmi těžko dosáhnout jen při využití klasických metod šlechtění.

Biotechnologické metody (jak KRE *in vitro*, tak i metody GI) by měly vhodným způsobem napomoci překonat tyto obtíže a pomoci urychlit a zkvalitnit šlechtitelský proces.

Využití biotechnologických metod lze spatřovat v:

- * rychlém namnožení materiálů cestou mikropropagace *in vitro*
 - * množení elitních rostlin - a získání geneticky uniformního potomstva, které může položit základ nové odrůdě - bez nebezpečí cizího sprášení při množení elitních rostlin nebo rodin,
 - * tvorba a množení materiálů pro syntetické odrůdy,
 - * množení linií - 00 řepky,
 - * množení materiálů pro testy rezistence -

- * získávání homozygotních linií cestou androgeneze *in vitro* - jeví se jako velmi perspektivní metoda tvorby homozygotních linií, mnohem rychlejší než klasickou cestou samosprašování rostlin, androgenetické rostliny lze namnožit mikropropagací a využít v mutačním šlechtění, rezistentním šlechtění, nebo zařadit do kalsikého výběrového postupu, resp. do fáze zkoušení a výběru nejvýkonnějších potomstev -

- * explantátové kultury řepky mají velkou perspektivu v oblasti mutačního šlechtění - relativně jednoduchá identifikace mutantů, možnost namnožení materiálů

- * využití v rezistentním šlechtění - vytvoření selekčního systému *in vitro* - aplikace toxických látek (herbicidů, filtrátů Phoma, Sclerotinia, černí, plísní) - selekce buněk, které *in vitro* vykazují odolnost/zvýšenou toleranci
problém bývá ale ten, že fenotypová proměnlivost indukovaná v *in vitro* kultuře je často nestabilní v dalších generacích a na úrovni celistvé rostliny se nemusí projevit

- * velmi perspektivní oblastí je využití metod GI u řepky - vnášení cizorodé DNA pomocí A.tumef. nebo přímo do protoplastů, - geny rezistence glyfosátu a alším herbicidům, resistance hmyzím škůdcům (gen pro δ -endotoxin B.thur.), změněná skladba aminokyselin v proteinu, změna skladby mastných kyselin v oleji

Mikropropagace *in vitro*:

První práce se týkaly rychého množení řepky pomocí internodálních řízků (růst *in vitro* - řízkování - kořenění na mediu - převod do půdy). V současné době se využívá regenerace rostlin z meristémů - nejarovizovaných apikálních nebo axilárních meristémů, převod do *in vitro* podmínek na MS mediu - regenerace rostlin, rostlinky s pak převádí na kořenící médium a do půdy.

Regenerace rostlin **cestou SE** - rod *Brassica* je jeden z mála druhů (taxonů), kde se vyskytuje sekundární SE - sekundární somatická embrya (embryoidy) vznikají z epidermálních buněk hypokotylu (u rostliny regenerované z pylových embryoidů), z buněk somatických embryí - z 20 - 60 % se vyvíjí v normální rostliny. Somatická embrya vznikají z kořenů, stonků, mladých listů, kvěních primordií, zygotických embryí. Průběh SE (tvorby somatického embrya) je téměř shodný s vývojem zygotického embrya. Tuto metodu - SE -je možné využít k vegetativnímu množení žádoucích genotypů. Pokud se jedná o přímou SE, bez mezistádia kalusu, např. tvorba embryoidů na mladých hypokotylech nebo zygotických embryích, je zychována genetická identita a uniformita vzniklého potomstva. Zjištěná variabilita mezi regenerovanými rostlinami pak nepřevyšuje variabilitu při klonovém množení.

Kalusové a buněčné kultury, regenerace rostlin:

dochází ke zvýšení genetické variability, uvažuje se o využití selkčně - mutačního systému *in vitro*. K odvození kalusů dochází z listových segmentů, stonků i meristémů, částí kořenů - kalogeneze (více AUX), růst kalusu, regenerace

rostlin (více CYT) - regenerace rostlin v kalusové kultuře může probíhat cestou organogeneze nebo SE. V případě SE v kalusové kultuře - projevuje se větší úroveň genetické variability u regenerovaných rostlin - buňky, ze kterých se embryoidy vyvíjejí jsou značně heterogenním systémem. Projevují se cytologické, biochemické odchylky u regenerovaných rostlin, nárůst (širší) genetická a epigenetická variabilita.

Buněčné kultury:

roztřepání kalusu v tekutém médiu, lze je použít v selekčním nebo mutačně-selekčním systému *in vitro* - nutné pro tento postup je ověřený a stabilní regenerační systém, jako nejvhodnější se jeví embryogenní genotyp - embryogenní kalus dává i „stabilní“ embryogenní suspenzní kulturu schopnou regenerace.

Protoplastové kultury:

úroveň regenerace rostlin z protoplastů je velice nízká, lze provádět různé manipulace s protoplasty - tvorba syntetické řepky - fúze protoplastů původních druhů. Cytoplasmatická hybridizace - do cytoplasmy *Raphanus* se přenáší jádra *B.campestris*, *B.napus* (přenos CMS).

Embryokultury:

opět využití k dopěstování hybridních embryí po vzdálené hybridizaci - *B.napus* x *Raphanus sativus* - přenos CMS, resyntéza řepky

Androgeneze *in vitro*:

pylová embryogeneze - vytváření haploidních embryí v prašnickové nebo mikrosporové kultuře. Prašnickové kultury jsou jednodušší, pro stimulaci tvorby embryí se využívá kultivace při vyšších teplotách (30-35 C), výběr embryogenních genotypů. Většinou jsou embryoidy - a posléze haploidní rostliny - získávány od jarních řepok, u ozimých je produkce haploidních embryí/rostlin nižší.

Druhým způsobem získávání androgenetických haploidních (a po kolchicinací diploidních - dihaploidních - double haploidních) linií je navození pylové embryogeneze v pylové kultuře, tj. kultuře mikrospor. Výhody této metody

spocívají zejména ve zvýšení průměrného výnosu embryí/rostlin na prašník (u kultur prašníků 0-8 embryí na nasazený prašník a u kultur mikrospor 80-200 e./prašník.), v odstranění interakcí prašníku s mikrosporou (pylovým zrnem), snížení pracnosti, odstranění nebezpečí regenerace rostlin z diploidních pletiv prašníku a nitky. I tak zůstává výtěžnost haploidních rostlin elmi malá - v prašníku je kolem 17000 mikrospor.

Kritickým faktorem ovlivňujícím produkci embryí je kromě genotypu zřejmě i počet prašníků/mikrospor v 1 ml média. Produkce haploidních embryí je závislá i na dalších faktorech - fyziologický stav rostliny, místo odběru prašníů, fáze zralosti pylu (střední až pozdní jednojaderná fáze), chladové předpůsobení. Optimalizací složení kultivačního média lze dosáhnout i masové tvorby sekundárních embryí - množení haploidní linie, regenerace rostlin ze získaných embryí je v 50 - 90 % úspěšná.

Mikrospory lze i uchovávat - metoda kryoprezervace suspenze mikrospor - odstranění sezónnosti práce (pěstování rostlin ve skleníku, pozdní výsevy... a další způsoby roztažení pracovní špičky, kdy řepka kvete nevedou k úspěchu, v případě odběru prašníků v jinou dobu než je obvyklá doba kvetení slně snižuje schopnost regenerace).

U regenerovaných rostlin se provádí cytologická kontrola počtu chromozómů - selekce na haploidní počet. Diploidizace haploidních rostlin - máčení mladých květních stonků v kolchicinu, injekce k vrcholovému meristému.

U jarních řepk (několika genotypů ... Topas) jsou propracovány docela dobře fungující systémy regenerace haploidních rostlin, u ozimých řepk se často setkáváme i s závažnými problémy, propracována je technika prašníkových kultur.

Nejdůležitější metodou *in vitro* je asi technika androgeneze - homozygtní linie jsou oproti klasickým šlechtitelským metodám získávány po jedné generaci kultivace *in vitro*. Dále je nadějný systém selekce a mutageneze *in vitro* (nebo detekce mutací *in vitro*).

Významná je i metoda SE - jak pro množení geneticky stabilního materiálu, tak i pro rozšíření genetické variability - SE v kalusové kultuře, regenerací rostlin ze sekundárních embryoidů byla získána somaklonální variabilita v obsahu

glukosinulátů, kas. erukové, morfologické znaky. Perspektivu mají i protoplastové kultury, metody GI.

Len

biotechnologické metody by měly napomoci zejména urychlení šlechtitelského procesu, perspektivně se ukazuje možnost přenosu nebo indukce rezistence vůči patogenům - *Phoma*, ve zlepšování kvality vlákna, oleje.

Orgánové kultury - nejpropracovanější, adventivní pupeny, množení materiálu *in vitro*, meristémy, zygotická embrya.

Protoplasty - některé genotypy i regenerují

Selekce *in vitro*, transformace

Slunečnice

regenerace rostlin z děloh

embryokultury - dopěstování embryí po vzdálené hybridizaci - přenos genů rezistence chorobám, změna složení poměru mastných kyselin v oleji, zvýšení obsahu proteinu, zdroje a přenos CMS.

Rostlinné biotechnologie a šlechtění na kvalitu oleje:

Různé směry využití rostlinných olejů - technické, potravinářské, oleochemie

Možnosti, které poskytují současné (v současné době šlechtěné a šířeji pěstované) olejniny jsou někdy limitované, nutnost dalšího intenzivního zlepšování + se zdůrazňuje otázka domestikace nových druhů olejin (*Crambe*, *Jojoba*, *Lesquerella*, *Cuphea*).

Šlechtění a mutačně selekční programy:

- * snížení/zvýšení hladiny kyseliny erukové u řepky - vzdálená hybridizace u řepky
- * mutace u soji - linolenová kys. - pokles až na 4 %, řepka 3 - 5 %, slunečnice - 90 % kys.olejová , len - 50 % kys.linolenové, mutanti - velmi nízký obsah - použití vhodné i pro potravinářské účely

Metody molekulární biologie:

- * - regulace tvorby mastných kyselin - v tomto případě je první otázkou nalézt geny kódující dané enzymy - enzymy biosyntézy mastných kyselin (acetyltransferázy, desaturázy)
- * - práce na *A.thaliana*, sinicích - tam už jsou některé geny identifikované a klonované - podle nich se hledají eukaryontní geny
- * - budoucnost - transformace řepky, slunečnice - *A.tumef.*, mikroinjekce

IX. Využití kultur rostlinných explantátů u luskovin.

Luskoviny patří k velmi významným plodinám - vysoká produkce kvalitních bílkovin s vysokou nutriční hodnotou, získávání rostlinných olejů.

Metody selekce *in vitro* (rezistence k chorobám a stresovým faktorům) - změna složení zásobních proteinů, metody GI, androgeneze a gynogeneze *in vitro*, somatická embryogeneze.

Hrách

Hrách je jedna z nejlépe geneticky charakterizovaných rostlin, genetické založení jednotlivých znaků, asi 5000 genů - ale u pohledu *in vitro* technik patří luskoviny k obtížnějším druhům, kdy zejména náročnější techniky - SE, suspenze, protoplasty jsou hůře propracované.

Z klasických metod šlechtění převažuje kombinační křížení - samosprašnost, snadná mezidruhová hybridizace (*Pisum* sp.), lehká technika křížení. Mutační šlechtění - není příliš významné, ve světě jen 9 odrůd - přímá mutace nebo křížení s mutantem.

Přesto se při klasických metodách naráží na zatím nepřekonatelné problémy (zvýšení obsahu bílkovin, lepší skladba aminokyselin x výnos, dlouhá doba kvetení, neznámé zdroje rezistence vůči některým chorobám) - určité naděje se kladou do technik explantátových kultur, rekombinantní DNA.

Nejpropracovanější a nejpoužívanější technikou *in vitro* kultur u hrachu (a ostatně i u dalších luskovin je mikropropagace *in vitro* - tyto techniky mají i praktické využití. R. 1974 byla touto technikou regenerována první kompletní rostlinka.

Mikropropagace in vitro

- meristémová kultura (kultura vzrostných vrcholů) - výchozím explantátem je apikální nebo axilární meristém, v *in vitro* kultuře dochází k indukci tvorby

výhonků - vytváří se jich velké množství (70 - 100 i více), explantát lze pasážovat a výhonky regenerovat dále. Pak následuje dosti kritické období indukce tvorby kořenů (rhizogeneze) - u luskovin je zakořeňování regenerantů kritickou fází snad u všech. Silně závisí na genotypu, koncentraci auxinů, sacharózy, solí, stavu a stáří kultury, ročním obdobím. Po zakořeňování regenerované rostlinky následuje převod do půdy...

Hrách zužuje velký počet virových onemocnění (viry mozaiky, žluté mozaiky, proužkovitosti...) přenosných hmyzem i semenem.

Meristemová kultura založená z velmi malých meristémů - vzrostný vrchol a minimální počet listových primordií - o velikosti 0.2 - 0.3 mm může být prostředkem k eliminování virových onemocnění.

Využití meristemových kultur bychom mohli vidět také v udržování a množení geneticky cenných materiálů a somaklonů, množení sterilních mutantů, klonování nejlepších jedinců pro získání elitního osiva.

Regenerované rostliny v *in vitro* podmínkách dobře rostou a často dochází k indukci tvorby květů, jejich samoopylení a vývinu lusků *in vitro*. Tento jev může být docela zajímavý - nabízí se možnost využití technik oplození *in vitro* + embryokultury pro získání mezirodových hybridů (rezistence, indukce tvorby haploidů).

Pylové kultury

už před 15 - 20 lety se objevily zmínky o této možnosti u hrachu, ale pak byla tato otázka značně utlumena. Během dlouhodobé kultivace se vyvíjely embryoidy, zvyšoval se počet chromozómů na 4n.

Kalusové a suspenzní kultury

- regenerace z kalusové kultury je geneticky závislá (je asi jednoduše geneticky založená a je recesivní). Byly publikovány i možnosti uchování vysoké genetické stability v kalusové kultuře - v případě kalusu odvozeného z děloh, kultivovaného při nižší teplotě, a zachování krátkého období kalogeneze. U hrachu

se projevuje silný selekční tlak na regeneraci rostlin z buněk kalusu normálního diploidního genotypu.

Somatická embryogeneze byla popsána v roce 1987 - výchozím explantátem pro produkci embryoidů byla nezralá zygotická embrya. V roce 1988 - regenerace rostlin z protoplastů.

Bob

U nás druhá nejvýznamnější luskovina. Bob má velký počet druhů (12), je to dobrý cytologický model, ale nevyhovující šlechtitelsky z hlediska vazby genů - navenek veliká fenotypová variabilita - ale genetický základ se jeví jako dosti úzký, což omezuje možnosti kombinačního křížení.

Bob je cizosprašná plodina, hlavní metodou šlechtění je kombinační křížení, využívá se i mutací, studují se možnosti heterozního šlechtění - využití CMS. Limitujícími faktory kalsického šlechtitelského postupu je úzký genetický základ odrůd, pevná vazba genů - malý počet chromozómů.

Mikropropagace:

nejde o meristemovou kulturu jako takovou - jako primární explantát se využívají řízky z rostliny. Poměrně nízký je počet výhonků, získaných během kultivace „meritémů“ - 5 - 7. Lepší výsledky - tj. více regenerovaných rostlin, lepší zakořeňování poskytují rostliny ??? kvetoucí?? - s nízkým obsahem taninu.

Mikropropagace má obdobné využití jako u hrachu, ale vzhledem k tomu, že se jedná o cizosprašnou plodinu, tak už teď je využití této techniky ve šlechtění:

- * množení CMS rostlin, studium založení CMS
- * namnožení geneticky identického materiálu (překonání nízkého mmnož.koef. po samosprašení)
- * získání geneticky homozygenního materiálu - např. pro testy rezistence

Kalusové kultury

- bob patří mezi tkaňovkářsky nejobtížnější rostliny - toto platí nejen pro kalusové kultury, ale i pro ostatní typy kultur. A ačkoli se můžete o kalusech dočísti hodně, tak většina prací se zabývá optimalizací podmínek kultivace.

Ve šlechtění bobu se zdají býti zdroje genetické variability vyčerpány, přenosu genů z jiného druhu brání silná autoinkompatibilita, jsou výsledky z křížení s *Vicia narboensis* (linie rezistentní rzi).

Sója

je nejdůležitější zdroj bílkovin a rostlinných olejů na světě. původ kulturní sóje je stále otázkou.

Klasické metody šlechtění u soji jako samosprašné plodiny představuje kombinační křížení (obtížně se kříží), indukovaná mutagenese - rozšíření genetické variability (asi 20 odrůd ve světě). Heterozní šlechtění, otázka CMS je ve fázi výzkumu.

Biotechnologické přístupy ke šlechtění by měly napomoci rozšíření genetické variability - zdroje rezistence, zvýšení obsahu bílkovin, olejů, jakost oleje - změna zastoupení mastných kyselin, rezistence vůči herbicidům - tyto požadavky jsou těžko dosažitelné klasickými metodami šlechtění.

Mikropropagace *in vitro* -

na izolovaném vzrostném vrcholu (meristémová kultura) se docílí indukce tvorby mnohočetných výhonků.

Embryokultury

- spolu s technikou kultivace vajíček, mladých semen a lusků vedly k získání mezirodových hybridů (ale zatím se projevuje silná sterilita hybridů F1). Nyní se objevuje možnost využití embryokultur + indukovaná mutagenese v přímém uplatnění v novošlechtění sóje.

Somatická embryogeneze (regenerace de novo)

- až doposud jsme hovořili o regeneraci z již organizovaných, založených orgánů a struktur. V případě regenerace de novo existuje systém regenerace cestou organogeneze, ale... - původ ve více buňkách, variabilita, chiméry. Druhou možností regenerace je somatická embryogeneze - a právě sem se v posledním období vrhlo obrovské úsilí a prostředky.

První rostlinky sóje regenerované SE se objevily asi v roce 1985. Nejvýhodnějším primárním explantátem je nezralé embryo - tvorba somatických embryoidů probíhá buď přímo na výchozím explantátu nebo po krátké subkultivaci v kalusu, a pokud se podaří vyselektovat embryogenní kalus je možno jej roztřepat v tekutém médiu a získat embryogenní suspenzní kulturu. Další kultivací *in vitro* vede k sekundární embryogenezi - tj. vlastně kontinuální produkci embryoidů (somatických embryí) v *in vitro* kultuře.

Obrovským problémem je prorůstání vzniklého somatického embrya - pravděpodobnou příčinou je vysoká koncentrace ABA, projevuje se velká dormance embryoidů, kalusovatění embryoidů. Prorůstání embryoidů lze napomoci jejich desikací (vysušením) - 50 - 60 %.

Protoplastové kultury

technika je poměrně propracovaná, fúze protoplastů sóji s protoplasty tabáku, ocúnu, rýže, po fúzi došlo k vytvoření kalusu (mikrokalusu), ale další vývoj byl zastaven, žádný regenerant - produkt fúze protoplastů.

Regenerace rostlin sóje z protoplastů - bylo by možné využít pro využití přímých metod transformace DNA, elektroporaci...

Uvažuje se i o navození somaklonální variability v *in vitro* kultuře, případné selekci *in vitro* na řadu zajímavých vlastností - odolnost virózám, plísním, herbicidům, uvažuje se také o transformaci sóje - A.tumef., mikroprojektily...

Intenzivní práce na sóji - během 80. let - obrovský pokrok, rozpracovaly se asi všechny techniky *in vitro*, a byla tu přítomná i jejich rychlá aplikace ve šlechtění (mezirodová hybridizace, som.var.), propracovává se i selekce *in vitro* - rezistence vůči biotickým i abiotickým faktorům, změna obsahu i skladby oleje a bílkovin.

X. Využití rostlinných biotechnologií (kultur rostlinných explantátů) ve šlechtění a množení brambor.

Rod *Solanum* zahrnuje přes 2000 druhů, 150 z nich tvoří hlízy, 8 z nich se pěstuje (4x 2n, 2x 3n, 1x 4n, 1x 5n), další druhy se využívají ve šlechtění jako donory genů rezistence.

Vzhledem k biologii rozmnožování této rostliny a způsobu pěstování lze nalézt nejdůležitější záměry šlechtění a pak i možnosti využití RB:

- * - vegetativní rozmnožování - zvýšené nároky na odolnost / toleranci patogenům - virovým chorobám (Y - čárkovitost, M, X, S, A, virus svinutky), bakteriálním, houbovým chorobám, háďátku bramborovému.
- * - způsob pěstování - různé nároky na kvalitativní ukazatele podle způsobu zpracování, plně mechanizovaná výroba brambor - kratší vegetační období, odolnost mech. poškození, skládkové choroby.

Klasické metody šlechtění: - křížení - brambor je složitý heterozygot, po křížení se získává velké množství hybridního materiálu, následují výběry, hodnocení materiálu. Vegetativní způsob rozmnožování umožňuje uchování vlastností a heterozygotních genotypů, vyšlechtění odrůdy trvá ; 15 let.

Využití RB ve šlechtění brambor:

- - prvořadý je význam ozdravování materiálů od původců virových chorob (materiály v novošlechtění i v udržovacím šlechtění) a masové rozmnožení ozdraveného materiálu
- - možnost dlouhodobého uchovávání materiálů v podmínkách *in vitro* (meristémová kultura, mikrohlízky, kalus - *in vitro* genová banka)
- - využití kultur *in vitro* v rozšiřování genetické variability - výhoda je ve vytváření nových genotypů (s takovou kombinací genů, kterou je složité nebo nemožné získat klasickým křížením), selekce *in vitro*.

Ozdravování od chorob:

pomocí meristémových kultur je možné eliminovat původce chorob u *in vitro* regenerované rostliny,

meristémy (meristemický dóm + 1 - 3 listová primordia) - apikální nebo axilární - se získávají z klíčků nebo stonků - úspěšnost ozdravování a regenerace rostlin ovlivňuje řada faktorů, zejména pak velikost primárního explantátu a charakter patogena,

meristém je 0.25 mm velký - buňky meristému a nejmladší listová primordia viry se vyznačují různým stupněm agresivity a schopností pronikání do meristémů/dělicích se buněk vrcholových meristémů - nejagresivnější (proniká až do vrcholového meristemického dómu je viroid vřetenovitosti hlíz PSTV, po něm následují viry X, M, S - nejméně agresivní, tj. největší neinfikovaná oblast je u virů Y, A, viru svinutky

pro účinné odstranění agresivních virů/viroidů/příp. dalších patogenů je nutné kombinovat tuto metodu (*in vitro* ozdravování pomocí meristémových kultur) a chemoterapií nebo termoterapií.

je nutné si také uvědomit, že se snižováním velikosti izolovaného a kultivovaného meristému také klesá schopnost regenerace rostlin. Velikost odebíraného meristému je pak určitým kompromisem - na jedné straně nutnost zachování regenerační schopnosti (zvětšování explantátu) a na druhé straně co možná nejúspěšnější ozdravení - eliminace patogena (zmenšování explantátu).

chemoterapie - používání chemických látek - k eliminování virů (a jiných patogenů) v meristémových kulturách - benomyl, analogy dusíkatých bází - thiouracil, azadihydrouracil, virazol - za normálních podmínek (mimo *in vitro* kulturu) tyto látky nemusí mít virostatický účinek - někdy se projevuje fytoxicity těchto látek - zjišťuje se také virostatický účinek i látek běžně obsažených v médiu - 2,4-D, kinetin - je nutné testovat virostatický účinek chemických látek, jejich toxicitu vůči rostlině/explantátu, posuzovat schopnost regenerace - a nezbytná je detekce přítomnosti/nepřítomnosti virů v regenerovaných rostlinách

termoterapie - využívá rozdílů v teplotách, při kterých probíhají životní/růstové procesy virů a hostitelských rostlin - termoterapii (zejména působení zvýšených teplot) se vystavují hlízy, intaktní rostliny nebo rostliny či meristémy kultivované *in vitro*

při vystavení rostlinného materiálu teplotám 32 - 39 °C po 5 - 10 týdnů dochází ke snížení hladiny těžko odstranitelných virů - pro eliminování PSTV se používá nízkých teplot 5-10 °C

- eliminace bakteriálních chorob (+ mykoplazmóz) - těžká detekce patogena, bakterie i latentně přežívají v rostlině, používají se metody imunodetekce, využívají se metody molekulární biologie pro detekci původců chorob - kultivační médium - regenerace *in vitro* - MS, B komplex vitamínů, vhodná kombinace růstových regulátorů - jinak dochází ke tvorbě kalusu

Klonování *in vitro*:

- meristémové kultury, regenerace rostlinek z kultivovaných meristémů
- nodální řízků - méně náročné než meristémy, množitelský koeficient je odrůdově závislý, získává se 3 - 10 nových rostlinek, růst řízků se urychluje přidáním kys.giberelové (GA), NAA
- horizontální kultivace stonků (layering) - stonky se umísťují horizontálně na povrch média - potlačení apikální dominance, dochází k prorůstání úžlabních pupenů v nové výhonky, tento postup lze opakovat - za 3 - 4 týdny lze vyrostlý výhonek znovu položit na médium
- mikrotuberizace (produkce mikrohlízek *in vitro*) - možnost využití této metody pro množení ozdraveného materiálu, lze využít i dormance hlízek (někdy ale bývá nerovnoměrná) pro vytvoření zásoby materiálu pro vysazování do polních podmínek, při výsadbě není také tak velké % napadení chorobami mikrotuberizace se docílí stimulací regenerovaných rostlin, n. rostlin vyrostlých z řízků *in vitro* kultivovaných na MS médiu, rostliny se přelijí tekutým médiem s vysokým obsahem sacharózy (sacharóza a BAP stimuluje tuberizaci), rostliny se přemístí do tmy, po 3 měsících rostliny zasychají a sklízí se hlízky

- tvorba adventivních výhonků: - tvorba na kultivovaném meristému *in vitro* - regenerace značného množství prýtů (rostlinek)
- tvorba adventivních pupenů (také přes kalus) na listových explantátech - u odrůdy Desireé - ačkoli se v těchto případech nezjistil žádný výskyt fenotypových nebo genotypových odchylek, upustilo se od využívání této techniky pro účely klonování bramboru *in vitro* - z důvodu možnosti vzniku spontánních mutací a zvýšení genetické variability.

Dlouhodobé uchovávání materiálu *in vitro*:

Uchovávání genových zdrojů, výchozích materiálů pro šlechtění v *in vitro* podmínkách - ochrana proti reinfekci virovými chorobami, malé nároky na uskladňování, možnost výměny materiálu (bez karantény, bez problému s vegetační dobou - J.Amer./Evropa)

- kultivace na minimálním médiu - prodlužování subkultivační periody, není to ale příliš vhodný způsob, negativně se projevuje nízké % přežívání rostlin
- kultivace na médiích s přídavkem retardantů růstu - zkrácení internodií, některé látky (CCC) mají i vliv na tvorbu hlízek - značně se prodlužuje přežívání kultury
- kultivace při snížených teplotách - prodloužení subkultivační periody při teplotách do 10 C + krátký den, tvorba mikrohlízek (ty lze při teplotě 2 - 4 °C udržovat až 1 rok - kryoprezervace
- uchovávání při teplotách -10 - -15 °C (vlivem kryoprotektiv nedochází ke zmrznutí cytoplasmy), i metoda zmrazování v kapalném dusíku - stonkové vrcholy, meristémy, možnost uchovávání materiálu po neomezenou dobu.

Techniky rozšiřující genetickou variabilitu

Indukce tvorby haploidů:

- převážně se postupuje cestou androgeneze, zatím neznámé faktory určují další vývoj mikrospor: - normální pylové zrno - pylové embryoidy - pylový kalus je genotypově závislý, některé materiály nesou znak zvýšené androgenní schopnosti

využití androgeneze *in vitro* je zejména v získávání monoploidních rostlin.

Zatím hypotetické schéma: - normální 4n rostlina bramboru - haploidizace - diploidní materiál (2n) se získává využitím techniky indukované partenogeneze po křížení *S.tuberosum* x *S.phurea* - monoploidní rostliny - se získávají androgenezí *in vitro*, výběr recesivních mutantů, mapování genotypu ..., produkce homozygotů 2n, 4n, v tomto případě by bylo možné i množení semeny Izrael Obnovení tetraploidního počtu chromozómů je možno kolchicinací, nebo regenerací z kalusů. Objevila se i myšlenka vyšlechtění n. výběru monoploidních linií s různými rezistencemi a pak jejich složení do 4n rostliny (fúze protoplastů a křížení 2n rostlin).

Regenerace mutantů z nodálních řízků a izolovaných pupenů:

Působené gama záření na rostliny - *in vitro* regenerace rostlin, zjišťování výskytu mutantů (tímto způsobem se získává větší podíl chimér)

Kalusové kultury:

Regenerace rostlin je závislá na genotypu, ale i na vyváženosti růstových regulátorů v médiu. Zjišťování variability v charakteru natě, tvaru hlíz, zbarvení šlupky a dužiny hlíz, obsahu škrobu, cukrů, odolnosti plísní.

Selekce *in vitro*:

Cílem je zefektivnění výběru regenerantů se žádooucími znaky a vlastnostmi.

selekce na zvýšenou rezistenci chorobám - přidávání filtrátu z plísně bramborové do média - získání regenerantů odolnějších plísní, pozornost se věnuje i selekci na odolnost fuzariózám, toleranci iirovým chorobám, mokré hnilobě

- selekce *in vitro* může proíhat na úrovni kultivace kalusu nebo i buněčné suspenze - suspenzní kultury se využívají pro selekci mutantů?? odolnějších stresovým faktorům, zvýšenému zastoupení esenciálních aminokyselin, s větší odolností mrazům??, zasolení, herdicidům -- zatím se podařilo získat jen buněčné linie, ne regeneranty

Protoplastové kultury:

využití pro získávání mutantů - není tak velká ztráta regenerační schopnosti jako u buněčných kultur (kratší období dediferencované *in vitro* fáze)

somaklonální variabilita byla zjištěna u celé řady významných znaků

možnost využití i metod GI - přímý přenos DNA, somatická hybridizace - např. přenos genů rezistence z planých druhů (jinak to asi nejde protože při normálním křížení dochází k eliminaci jejich chromozómů - *S.phureja*, *S.chacoense*)

Systém produkce bezvirózní sadby:

- 1. ozdravování od viróz - meristémová kultura, doplněná chemoterapií nebo termoterapií regenerace rostlinek
- 2. klonování rostlin v *in vitro* podmínkách - nodální řízků, horizontální kultivace stonků, případně může být doplněno mikrotuberizací *in vitro* namnožení značného množství bezvirózního materiálu
- 3. vysázení do nesterilních podmínek - do skleníků, síťovníků sklizeň bezvirózních hlíz
- 4. polní pěstování a množení bezvirózní sadby celý systém agrotechnických a ochranných opatření k zabezpečení nízké úrovně reinfekce

Na všech stupních je nutná kontrola zdravotního stavu ! (1+2 *in vitro* podmínky - regenerace rostlin 3 - produkce bezvirózní sadby pro množitele 4 - "pěstitele")

XI. Využití kultur rostlinných explantátů u semenných okopanin.

K semenným okopaninám řadíme cukrovku a krmnou řepu. Z botanického hlediska tyto plodiny (*Beta vulgaris* ssp. *altissima* a ssp. *crassa*) patří do čeledi Cheopodiaceae a je jim příbuzných ještě asi 15 planých druhů - které můžeme považovat za genové zdroje různých významných vlastností. Plané druhy mají různý stupeň ploidie - 2n, 4n, 6n. Kulturní formy jsou diploidní, tetraploidní odrůdy (populace), diploidní a triploidní hybridy.

Cukrovka a krmná řepa jsou typické cizosprašné plodiny, populaci tvoří jedinci s různě silným stupněm AI - starší odrůdy jsou složité heterozygotní populace. Šlechtění je zaměřeno na výnos a kvalitu bulev (výnos bulev a cukru, kvalita šťávy), toleranci vůči nepříznivým podmínkám prostředí, odolnost chorobám a škůdcům (virové a houbové choroby ...).

Odrůdy cukrovky a krmné řepy se vytvářely metodou rodinového šlechtění (výběr nejlepších řep z nejlepších populací). V současné době se šlechtění ubírá cestou liniového šlechtění - je snaha vytvářet linie s CMS, a šlechtění hybridních 2n nebo 4n odrůd. Klasické šlechtění je časově a pracovně velmi náročné.

Metody kultur rostlinných explantátů *in vitro* mohou účinně napomoci zejména v urychlení a ulehčení šlechtitelského procesu - mikropropagace, dlouhodobé uchování materiálu v *in vitro* podmínkách, indukce haploidů, tvorba nových genotypů... U většiny technik se projevuje silná genotypová závislost schopnosti kultivace *in vitro*.

Dlouhodobé uchování materiálu:

dlouhodobé uchování je výhodné z hlediska uchování klonů *in vitro* - jejich udržení v nezměněném stavu až do vyhodnocení jejich kombinační schopnosti (a pak mikropropagací rychlé namnožení materiálu)

při dlouhodobém uchovávání se využívá kultivace při snížených teplotách (2 - 5 C), jako výchozího objektu se používá meristémových kultur nebo malých rostlinek

Mikropropagace *in vitro*:

při použití klasických metod klonového množení (listové řízky, axilární pupeny) je velmi nízký množitelký koeficient - v *in vitro* podmínkách lze získat větší počet materiálu cestou

- - organogeneze v kalusové kultuře
- - stimulací axilárních výhonků z částí soukvětí
- - "- ze vzrostných vrcholů
- - regenerací pupenů na listech

- výchozím explantátem se semenáček (u množení linií) nebo segmenty květního stonku, zavřená poupata

potlačení apikální dominance - na bázi regenerují rostliny - u některých genotypů dochází k tvorbě adventivních pupenů a regeneraci rostlin z řapíku a hlavní žíly čepele

Hlavní oblasti využití mikropropagace:

- - množení liniového materiálu - CMS linie, O-typy
- - množení elitních rostlin - pro tvorbu syntetických populací a F1 hybridů (rostliny jsou uniformní, generativně množené linie mají jistý stupeň variability)
- - dlouhodobá konzervace cenných genotypů - udržování a množení rostlin, které se nedají množit generativně (haploidi, hybridy s planými druhy, AI linie)

Kalusové kultury:

Nejvhodnější pro indukci tvorby kalusu jsou řapíky listů, objevují se i habituované kalusy (schopné růst na médiu bez růstových látek), organogeneze z kalusů je problematická a regenerace rostlin je nízká.

Došlo i k odvození suspenzní kultury, a některé suspenza byly i schopné produkovat embryonální struktury.

Protoplastové kultury:

Na několika pracovištích se podařilo získat regeneranty z protoplastových kultur cestou somatické embryogeneze. Obecně ale platí nízká frekvence dělení v protoplastových kulturách, a tedy i nízká schopnost regenerace.

Indukce tvorby haploidů:

Řepa je dvouletá cizosprašná plodina - pro tvorbu linií je velmi nadějná a vhodná technika indukce haploidů *in vitro* = tvorby homozygotních linií.

- klasické metody získávání haploidů - vyhledávání spontánních haploidů, opylování ozářeným pylem, vzdálená hybridizace s cviklou velmi nízká frekvence - 2*10 - 1*10 haploidů

Techniky indukce tvorby haploidů *in vitro*:

- - androgeneze - nepříliš úspěšná metoda, ojediněle se z prašníků vytváří kalus - značně heterogenní, podařilo se regenerovat jen 2n rostliny.
- - gynogeneze - jako perspektivní se ukázala metoda produkce haploidů prostřednictvím kultivace neoplozených vajíček, dochází k tvorbě kalusů, malformovaných struktur, ale i embryí - možnost regenerace rostlin nebo prorůstání v haploidní rostliny (asi 2 %).

Jev je to poměrně silně genotypově závislý, kultivace na MS + 2,4-D. Existují značné rozdíly v responsibilitě jednotlivých genotypů - dále se vyvíjí 0 - 7 % vajíček, u jednoho genotypu byla zjištěna tvorba embryí u 27 % nasazených vajíček.

Touto technikou, tj. kultivací neoplozených vajíček *in vitro*, lze získat velké množství haploidů - a z nich homozygotní linie. Metoda s jeví jako vhodný doplněk

klasických metod liniového šlechtění - u genotypů, které budou responsibilní (budou reagovat na indukci haploidie), by mohla probíhat produkce haploidů = linií metodou gynogeneze *in vitro*, u ostatního materiálu „klasickou“ metodou tvorby inzuchtních linií.

Regenerované haploidní rostlinky mohou diploidizovat buď spontánně (problematické, kontrola homozygotnosti např. pomocí isoenzymů - zda se jedná o heterozygoty nebo homozygoty), nebo aplikací kolchicinu v *in vitro* podmínkách nebo kolchicinací rostlin po převodu do půdy.

Homozygotní linie se mohou namnožit metodami klonování *in vitro* (zejména materiály nesoucí sterilitu - CMS nebo AI) nebo i generativně - důležitá je důkladná izolace materiálů. linie slouží jako výchozí šlechtitelský materiál pro tvorbu hybridů v dalším šlechtění.

XII. Využití kultur rostlinných explantátů u pícních trav.

Trávy tvoří dominantní složku přirozených porostů, luk, pastvin - a tak tvoří významnou složku ktmivové základny, příznivý je i jejich vliv na strukturu půdy a životní prostředí.

Z taxonomického hlediska tvoří pícní trávy velmi heterogenní skupinu čeledi *Poaceae* - na jejich evoluci se významně podílely jevy polyploidie, vzdálené hybridizace, přestavby genomů. Přirozený výběr - adaptace k podmínkám prostředí vedla ke vzniku ekotypů - ty jsou jedním z cenných genových zdrojů pro současné šlechtění. Z hlediska biologie rozmnožování je většina druhů trav cizosprašná, vyskytuje se i samosprašnost (plané jílky) a apomiktický způsob rozmnožování (lipnice luční).

Jak je tedy vidět, tato skupina je taxonomicky, cytologicky i geneticky značně heterogenní, navíc se jedná o jednoděložné rostliny - a tyto všechny faktory z ní dělají skupinu dosti problematickou z hlediska využití TK.

Je snaha využít *in vitro* techniky k urychlení a zkvalitnění šlechtitelského procesu, jako vhodný doplněk klasických metod šlechtění. Pokud vyjdeme z předcházející charakteristiky této skupiny - pak šlechtění zahrnuje:

- - etapu shromažďování rozsáhlého šlechtitelského materiálu
- - vytváření vlastní šlechtitelského materiálu (z klasických šlechtitelských metod se převážně využívá křížení - kombinační, zpětné - rezistence, vzdálená hybridizace, mutační a polyploidní šlechtění, heterozní šlechtění - F , syntetické populace)
- - výběr a hodnocení materiálů
- - množení nejlepších novošlechtění, zkoušky ...

Převládající cizosprašnost, genetická heterogenita, autoinkompatibilita, malá prošlechtěnost, téměř neznámé genetické založení mnohých znaků limitují klasické metody šlechtění. Mnohé nevyřešné nebo těžko dosažitelné cíle by právě mohly napomoci řešit biotechnologické metody.

V současné době jsou hlavní oblasti využití explantátových kultur *in vitro* a metod molekulární biologie u trav následující:

- - mikropropagace šlechtitelsky cenných genotypů + ozdravování
- - dlouhodobé uchovávání cenných genotypů a jejich konzervace - *in vitro* genová banka
- - metody rozšiřování genetické variability - využití somaklonální variability, indukce polyploidie a mutageneze *in vitro*, selekce *in vitro*
- - embryokultury - dopěstování hybridních embryí po vzdálené hybridizaci
- - indukce haploidů *in vitro* - získávání homozygotních linií
- - endospermální kalusové kultury
- - konstrukce nových genotypů
- - vnášení cizorodé DNA + mapování genomů, identifikace

U trav se klasickými metodami nedaří dosáhnout (nebo jen velmi zřídka) např. přenos CMS a apomixe, tvorba a homozygotních linií, získávání rezistentních / tolerantních rostlin vůči herbicidům, virovým chorobám, zvýšení intenzity fotosyntézy (fúze C a C chloroplastů, získávání transgenních rostlin - obsahové látky, rezistence, fixace N . V těchto oblastech můžeme vidět perspektivní využití biotechnologických metod.

Mikropropagace a *in vitro* ozdravování:

Mikropropagace *in vitro* je možné dosáhnout regenerací rostlin v meristémové kultuře - jako primární explantát se používá apikálních, axilárních i interkalárních meristémů. Při kultivaci je nutné vyzkoušet a optimalizovat koncentraci růstových regulátorů (AUX - CYT) - jinak dochází ke tvorbě kalusu. Regenerace rostlin je kritickým momentem ! a stejně tak i přežívání regenerantů po převodu do půdy je značně závislé na genotypu, velikosti primárního explantátu, fyziologickém a zdravotním stavu rostliny... Systém mikropropagace *in vitro* byl ověřen u jílků, kostřavy, srhy, bojínku.

Tímto způsobem je možné uchovávat stávající genotyp výchozí rostliny a docílit namnožení cenného, nebo požadovaného materiálu (např. pro sestavování syntetických odrůd), vlastně se jedná o klonové množení *in vitro*.

Jsou i záměry využít získané regeneranty pro testy rezistence, sestavování syntetických populací - a využít tak *in vitro* techniky místo klasického vegetativního způsobu množení a udržování klonových školek (úspora práce, prostoru, vyloučení nebezpečí změny genotypu množeního materiálu ! - po optimalizaci podmínek kultivace).

Meristémové kultury lze využít i k eliminaci zejména virových, případně houbových chorob - obdobně jako u jiných plodin. Pro účely ozdravování se používá i kombinace s delší kultivací při snížených teplotách.

Dlouhodobé uchování genotypů:

Metoda dlouhodobého uchování (konzervace) genotypů spočívá v kultivaci meristémů - tuto meristémovou kulturu můžeme obdobně jako u jiných druhů udržet při snížené teplotě 1 - 4 C až 1 (- 2) roky bez pasážování. Tato technika je propracovaná u kostřav, ...? Přežívání meristémů je asi 50 - 80 % při uchování dobré regenerační schopnosti. pracuje se také na možnostech kryoprezervace *in vitro* - uchování materiálu při přerušení růstu - uchování při teplotách -15 C, -70 C, -196 C.

V těchto případech lze hovořit o systému *in vitro* genové banky (explantátová genová banka).

Metody in vitro jako prostředek rozšiřování genetické variability:

Indukce tvorby kalusu a regenerace rostlin jsou limitujícím faktorem pro využití explantátových technik (kalusových a buněčných kultur) ve šlechtění trav. Jako primární explantáty se využívají málo diferencované orgány a pletiva - meristémy, embrya, mladé listy, mladá soukvětí.

Indukce tvorby kalusu je velmi geneticky závislá (a když si uvědomíme, že se jedná o cizosprašné rostliny, kde odrůda je vlastně populací, souborem mnoha různých genotypů, pak mnohdy nelze metody *in vitro* využívat ve větší míře ve šlechtění), velký vliv mají i negenetické faktory - stupeň diferenciac (ale na úrovni genové regulace to může být dosti podstatný genetický faktor !), roční období, stav rostliny.

Regenerace rostlin z kalusů probíhá jak procesem organogeneze, tak i SE, a je silně závislá na genotypu, stáří kultury - s rostoucím počtem pasáží regenerační schopnost klesá.

Regenerace cestou SE probíhá z embryogenních kalusů - odvozených např. ze štítků mladých (nezralých) embryí, mladých soukvětí... - jílek, srha, kostřava...

U srhy byl tento regenerační systém již značně propracován - bylo dosaženo přímé SE z mladých listů, semeníků, prašníků (2n), byly odvozeny embryogenní buněčné kultury - a tyto práce vyústily v možnost komerční produkce „umělých semen“.

Během kultivace kalusu (nebo během procesu kalogeneze) může dojít i k různým mutačním změnám - byly regenerovány aneuploidní, chimérické i polyploidní rostliny křílku, sveřepu, hybridů jílek x kostřava.

Tohoto faktu určité genetické nestability se ale i po optimalizaci kultivačních podmínek využívá - je vypracován postup indukce kalogeneze na mladých květenstvích vzdálených hybridů - s cílem indukce polyploidie a obnovení fertility (regenerace zpolyploidizovaných - amfidiploidních rostlin).

Údaje o vzniku a projevu somaklonální variability u regenerovaných rostlin se různí - uniformita x značná variabilita. Genetická variabilita zjištěná v explantátových kulturách, případně u regenerantů se v některých případech projevuje i mimo *in vitro* podmínky - u klonových potomstev při vegetativním množení trav (jílek, kostřava) - pravděpodobně zde došlo ke změnám v karyoplazmatickém komplexu rostlin.

Velká část variability zjištěné *in vitro* může mít svůj původ už v explantátu před jeho kultivací *in vitro*, navíc zjištěná variabilita u regenerovaných rostlin může být epigenetické povahy, projevuje se určitý modifikační vliv podmínek *in vitro* kultivace. To celou situaci kolem využití somaklonální variability značně komplikuje.

Využití somaklonální variability, využití některých indukovaných mutací *in vitro* může mít větší význam asi u lipnice, kde lze těžko jiným způsobem navodit rozšíření genetické variability (apomiktické rozmnožování). U ostatních druhů trav, zejména cizosprašných, přirozený způsob rozmnožování + křížení s některými

„zajímavými“ genotypy přináší obrovskou šíří genetické variability využitelné ve šlechtění - mnohem širší než je rozsah odchylek, som.var. získaných *in vitro*.

Suspenzní kultury:

Suspenzní kultury lze získat kultivací/roztřepáním kalusu v tekutém médiu, ale ve značné míře regenerují albinózní rostliny. Kultura také velmi záhy významně ztrácí schopnost regenerace (což je dosti typické i pro další zástupce z Poaceae). Úspěchu bylo dosaženo u embryogenních genotypů srhy - embryogenní buněčná kultura - kontinuální produkce embryoidů („umělých semen“).

Protoplastové kultury:

Jedna z nejperspektivnějších oblastí - využití v systému selekce na buněčné úrovni, fúze protoplastů, přímý přenos cizorodé DNA - tvorba nových genotypů. Ale také velmi problematický typ kultury - velmi obtížná je regenerace z protoplastů, je zde velký výskyt albinózních rostlin, někdy se regenerace daří přes kalusovou kulturu. Embryogenní genotypy si ale podržují schopnost regenerace i v protoplastové kultuře (navíc kratší doba v *in vitro* podmínkách, velké množství protoplastů - rostlin, možná, že toto bude lepší způsob než buněčná suspenze).

Endospermální kalusové kultury:

Tato metoda byla propracována v poslední době a předpokládá kultivaci nezralých hybridních endospermů (jílku, kastřavy a jejich hybridů, lipnice). Při kultivaci *in vitro* se vytváří světlý, zrnitý, nesoudržný, velmi rozpadavý kalus, který má vysokou intenzitu růstu a vyznačuje se značným hromaděním zásobních látek (škrobu). Nepříznivou vlastností, která se u tohoto typu kalusu objevuje, je neschopnost (nebo nepřítomnost) reakce na růstové regulátory - a tedy i neschopnost diferenciací organizovaných struktur - neschopnost regenerace rostlin.

V několika případech byla na okrajích kalusů pozorována regenerace - ale regenerované rostliny měly diploidní počet chromozómů. Existuje pak předpoklad, že část buněk kalusů pravděpodobně vznikla z jiných pletiv než z endospermu.

Intenzivně se pracuje na získání endospermální kalusové kultury, schopné regenerace, která by umožňovala získat mezidruhové a mezirodové hybridy jílků a kostřav a hybridů apomiktických druhů lipnic !.

Embryokultury:

Využívají se k dopěstování nezralých i zralých hybridních embryí trav po vzdálené hybridizaci - za účelem získání hybridních rostlin:

jílek mnohokvětý x kostřava luční

-“- x k. rákosovitá

-“- x jílek vytrvalý

lipnice luční

Kultivace embryí je relativně lehká, vliv na kultivaci má genotyp rostlin, vývojové stadium extirpovaného embrya, fyziologický stav rostlin,...

Embrya po izolaci se umisťují na povrch média, nebo na „chůvu“. Embrya po křížení některých kombinací se nepodařilo dopěstovat - silný vliv mechanismů postzygotické inkompability, poruchy vývoje hybridního endospermu a embrya.

Získané hybridní rostliny lze použít po obnově fertility ve šlechtění.

Indukce tvorby haloidů *in vitro*:

Tato metoda má vzhledem k cizosprašnossti trav značný význam. První androgenetické rostliny byly získány už na počátku 70. let, ale stále se - jedná o spíše ojedinělé úspěšné příklady.

Projevuje se silná genotypová závislost, nízká schopnost regenerace haploidních rostlin. Značným problémem zůstává výskyt albinózních rostlin - mezi

odvozenými haploidy mnohdy převládají (naopak mezi dihaploidy převládají zelené rostliny - zřejmě se jedná o důsledek exprese recesivních mutací).

V poslední době se daří přece jen lépe regenerovat rostliny SE z prašnickových kultur srhy a jítku, výhodné je i předpůsobení prašníků nízkými teplotami.

XIII. Využití kultur rostlinných explantátů u zelenin.

Před lety se uvažovalo, že tkáňové kultury jsou vynikajícím prostředkem pro množení rozličného rostlinného materiálu, + vynikající prostředek pro konstruování nových genotypů (fúze protoplastů, selekce *in vitro*, mutace *in vitro*). Tyto úvahy se později rozvinuly i v propracovávání metod *in vitro* u zelenin, které se jeví a stále zůstávají vhodným *in vitro* objektem - zejména z následujících důvodů:

- mnohé druhy patří ke snadnějším a propracovanějším objektům (z hlediska tkáňovkářského - *in vitro* pohledu)
- výhodná cena konečné produkce - finanční otázka bývá pro systém množení (případně další jiné manipulace *in vitro*) rozhodující
- obvykle poměrně rychlá návratnost vložených prostředků (explantátová laboratoř může přímo produkovat sadbu - osivo pro pěstitele)
- produkce odrůd, hybridů, jejichž získání bez použití biotechnologických metod by bylo problematické (hlavně mnohem pracnější a dražší)
- většinou je oproti polním plodinám zapotřebí málo rostlin na pěstitelskou plochu, na produkci osiva stačí malý počet „mateřských“ rostlin

Nyní je u zelenin pozornost zaměřena zejména na :

- využití indukce tvorby haploidů pro šlechtění androgenních, homozygotních dihaploidních D.H. linií
- mikropropagace *in vitro*
- produkce bezvirózních rostlin

Výzkum (zejména u nás) je prováděn ve spojitosti se šlechtěním odrůd, jako součást snah o vytváření/výzkum nových metod šlechtění, urychlení klasického šlechtitelského procesu - u klasických metod šlechtění se odrůda vytváří 10 - 12 - i více let, přičemž se odrůda (v našich podmínkách cca do roku 1992) nahradí za 17 let. Pro srovnání u polních plodin je období životnosti odrůdy 6 - 7 let, u polního hrachu 4 roky.

Šlechtění zelenin je časově velmi náročné, zaostává za šlechtěním polních plodin (zejména z pohledu zdokonalování šlechtitelských systémů, znalostí

genetického založení znaků...). Proto je stále silnější snaha dostat do šlechtění metody, které šlechtění zrychlují (zprogresivňují, či zefektivňují - cíl je získat co nejvíce kvalitních odrůd - zaměřených všemi možnými směry podle požadavků a nálad spotřebitele a zpracovatele, a samozřejmě výsledků ostatních šlechtitelů - v co možná nejkratším čase a samozřejmě vyhovět i požadavkům hygienických a dalších norem - co možná nejméně narušit zdraví konzumenta).

Metody a techniky *in vitro*, které působí na přímé urychlení šlechtitelského procesu:

Haploidní šlechtění - šlechtění na haploidní úrovni:

- metoda androgeneze *in vitro* - tj. využití prašnickových (pylových) kultur ke šlechtění homozygotních linií
- klasickým způsobem (pokud to je možné) trvá získání inzuchtované homozygotní linie 8 - 9 let
- při využití haploidní techniky - regenerace haploidní rostliny, její diploidizace toto období obecně trvá 10 - 18 měsíců
- musíme si ale uvědomit, že ale ne všechny objekty/genotypy na tento postup reagují - zcela je tato metoda zvládnutá u papriky - a šlechtění papriky vychází z D.H. linií, technika androgeneze *in vitro* se rozbíhá u mrkve, brukvovitých zelenin - technika klon-liniových hybridů
- druhou metodou šlechtění na haploidní úrovni je metoda gynogeneze *in vitro* - vychází z nezralých neoplozených vyjíčků, první rostliny byly touto technikou získány u cibule

Metody a techniky *in vitro*, které nepřímo působí na zkrácení šlechtitelského procesu:

- vegetativní množení linií pro hybridní šlechtění - je snaha propracovat tuto metodu u papriky - naráží se ale na problém, že paprika není příliš vhodný objekt

pro mikropropagaci *in vitro* - na druhé straně docela dobře jsou tyto metody rozpracovány u košťálovin (meristémy, SE, květák - růžice)

- využití *in vitro* technik u vzdálené hybridizace ve šlechtění zelenin:

- lze využít řady vlastností původních odrůd a planých druhů - přenést je do šlechtěného materiálu (košťáloviny - rezistence nádorovitosti, cibule - mrazuvzdornost, rezistence houbovým chorobám, lepší složení obsahových látek, rezistence háďátku, ...)

- po vzdálené hybridizaci - se využívá embryokultur k dopěstování hybridních embryí a získávají se hybridní rostliny

- uvažuje se i o využití metody fúze protoplastů, resp. o nesymetrické fúzi, o využití metod molekulární genetiky

Brukvovité zeleniny:

u tohoto rodu (*Brassica*) se vyskytuje obrovská variabilita

- při klasickém šlechtění (linií a hybridních odrůd) se 7 let vytváří linie, pak probíhají zkoušky kombinační schopnosti

- při využití biotechnologických postupů je snaha o vytváření linií cestou androgeneze *in vitro*, nejlépe na tento postup reaguje řepka a hořčice,

B. oleracea - reakce je poněkud horší, je obrovská variabilita mezi odrůdami - některé nereagují vůbec, u některých se poměrně dobře daří získávání androgenních linií (ale spíše u těch, které mají „divočejší“ charakter)

- vzdálená hybridizace - *B. campestris* - odolnost vůči nádorovitosti - z pekingského zelí, - embryokultury

- mikropropagace - meristémy, u kvěťáku se využívají růžice (na médium se dávají malé kousky květních růžic - množení např. mateřských linií), u některých genotypů se zkouší i využití metody SE - byly ohlášeny i technologie produkce „umělých semen“ u brukvovitých zelenin

- technologie produkce klon-liniových hybridů

- mateřská komponenta hybridní odrůdy je linie - získaná samosprašováním (inzuchtem) nebo androgeneticky
 - otec - „pěkná rostlina z vyrovnané populace“
 - křížení vybraných rodičovských rostlin - jestliže je hybrid vyrovnaný a výnosný - pak se otec namnoží vegetativně (jeho genotyp může být různý) - v tkáňové *in vitro* kultuře mikropropagací
 - hybrid takto vytvořený je životnější, dává dobrý a vyrovnaný výnos v rozdílných klimatických a pěstitelských podmínkách
-
- RC rostliny (rapid cycling - rychle cyklující rostliny, rostliny s rychlým/krátkou vegetačním cyklem/veg.dobou) - *B. campestris*, *B. oleracea* - sledování některých znaků, studium genetického založení významných znaků a vlastností

Paprika:

- hlavně se využívá tvorby androgenních D.H. linií - pro další hybridní šlechtění
- mikropropagace - zatím jsou problémy s množением materiálu *in vitro*

Rajče:

- používá se metoda androgenese *in vitro* - tvorba D.H. linií pro hybridní šlechtění n. tvorbu odrůd
- různé pokusy s transgenozí - odolnost herbicidům, oddalování zralosti a měknutí plodů
- kalusové kultury - SE, mikropropagace - somaklonální variabilita - regenerované rostliny odolnější plísni bramborové, zasolení...
- využití mutací - z rostlin ozářených gama zářením je odvozována kalusová kultura a docílují se regenerace rostlin - nejvíce utací se vytváří v buňkách mitoticky se dělících - DNA je jednovláknová a je nejpřístupnější mutační změně + pomocí tkáňových kultur se využívá i diplontické selekce (u chimér, které by se v

naprosté většině případů získaly normální cestou dochází k vyřazení somatických mutací z přenosu do další generace)

Mrkev:

- metoda andogeneze *in vitro* je v počátcích, je snaha získávat homozygotní linie pro hybridní šlechtění - tvorbu hybridních odrůd
- je i snaha o využívání pylové (prašnickové ??) sterility - pro hybridní šlechtění, získávání sterilních linií a jejich množení - intenzivní výzkum
- kalusové kultury - regenerace rostlin, zjištění somatické variability mezi regeneranty

Rod Allium - česnek a cibule:

cibule:

- u cibule *A. cepa* neexistuje gen pro rezistenci vůči botritidě, perenospoře, tyto gene rezistenc ale lze nalézt u jiných pěstovaných či planých druhů *A. fistulosum*, *A. schoeprastum*, *A. vavilovii*, *A. altaicum*
- se všemi těmito druhy je cibule křížitelná, ale pokřížení nelze získat semena nebo hybridní rostliny neposkytují semena - v prvním případě dochází k absorpci vyvíjejícího se hybridního embrya, destrukci endospermu a k dopěstování hybridní rostliny je nutné použít embryokultury, ve druhém případě většinou dochází k poruchám tvorby pylu, hybridní rostliny jsou sterilní (nebo částečně sterilní) a musí dojít k amfidiploidizaci - pak lze získávat např. triploidní hybridní odrůdy - rezistentní linie (4n) x *A. cepa*
- dále se při tvorbě odrůd, linií používá AI, CMS - tyto materiály pak lze množit mikropropagací
- u cibule jde jen velice těžko realizovat zkrácení šlechtitelského cyklu - v podmínkách, kdy cibule kvete mimo dobu biologického kvetení je sterilní, bez pylu
- pro tvorbu linií se začíná používat i techniky gynogeneze *in vitro* - kultivace neoplozených semeníků nebo vajíček a indukce tvorby haploidních rostlin

česnek:

- česnek *A. sativum* nevytváří semena, u tohoto druhu není možné šlechtění generativní cestou - lze jen vybírat nejlepší klony, které se dál vegetativně množí - tímto způsobem ale dochází k velkému zúžení genetické variability
- vegetativní způsob rozmnožování také vede k množení viróz - jedním z cílů *in vitro* technik je ozdravování od viróz a produkce viruprosté sadby během 3 let ale většinou dochází ke 100 % reinfekci a mnohdy i ke „zhroucení reinfikovaných rostlin“ virózy o 30 - 50 % snižují výnos, bezvirózní sadba se u nás produkuje jen v omezeném měřítku, pro ozdravení se používá meristémová kultura, pěstování rostlin pro množení v izolaci (sítě, v obilném poli)
- kalusové kultury - u dlouhodobé kalusové kultury se zvyšuje genetická (a epigenetická) variabilita u regenerantů, silně se projevuje efekt kultivace *in vitro* na genetickou nestabilitu materiálu, do média lze přidávat i mutagenní činidla - snaha o rozšíření genetické variability (mutagenní účinek při dlouhodobé kultivaci mají i některé látky z média - 2,4-D)
- snaha o odvození prooplastové kultury - selekce, fúze protoplastů, genové manipulace
- SE v kalusové kultuře
- snaha o křížení s planými druhy - embryokultury pro dopěstování hybridních embryí

XIV. Biotechnologie v lesnictví.

Vzhledem k dosti rychlému tempu devastace Země, tj. hlavně ničení deštných pralesů, lesů mírného pásma a desertifikace značných rozloh, se uvažuje, že tkáňové kultury (pokud člověk přežije) budou mít dosti značnou úlohu v produkci lesních a okrasných dřevin - pro ozeleňování a osidlování zničených ploch (výsypky, imisemi zasažené oblasti, okraje nových pouští...). V současné době se odhaduje potřeba řádově miliard ? (biliónů) sazenic lesních dřevin - a technika mikropropagace se svým vysokým množitelenským koeficientem a možná i určitým stupněm mechanizace a automatizace operací může produkovat potřebné obrovské množství nových rostlin.

Byl vypracován i určitý modelový postup - nejen teoreticky, ale na omezených plochách i v reálu - pro porovnání „výnosu lesních dřevin“ z kultury ošetřované normálním způsobem, tedy více méně extenzivní les, a z ploch pokusů, kde silvikultura a biotechnologie zvýšily produktivitu až o 75 - 300 % (douglaska *Pseudotsuga menziesii* a borovice *Pinus taeda*). Silvikulturou se zde myslí výsadba elitních materiálů, s prověřenou vysokou produktivitou, zavlažování a hnojení porostů (nejen mladých, ale i vzrostlého lesa), ošetřování proti škůdcům.

Tento program - tj. využití genetických a biotechnologických metod začal v 50. letech, cílem šlechtitelského programu bylo zvýšit frekvenci žádoucích genotypů v populaci lesních dřevin - asi to nebude jednoduchá záležitost, zvláště když si představíte lesní dřeviny - kde je obrovská genetická variabilita, dlouhé juvenilní stadium, dlouhé období než může být testováno a vyhodnoceno semenné potomstvo, prolematické je také řízené křížení a sběr semen...

Možnosti využití *in vitro* techniky:

množení elitních rostlin v *in vitro* kultuře (meristémy, som.embrya)
selektce nejlepších klonů

2. generace šlechtění + intenzivní klonová selekce vedla ke zvýšení výnosu o téměř 100 % ve srovnání s populací množenou volně ze semen vybraného jedince

klasické vegetativní množení - řízky (jen u několika druhů jehličnanů, obtíže při zakořeňování, špatný počáteční růst, malý množitelský koeficient, negativní vliv stárnutí matečních rostlin)

biotechnologické metody:

mikropropagace *in vitro* - z meristému, regenerace rostlinek

- somat. embryogeneze - meristém, embrya

kryokonzervace - až do vyhodnocení potomstva, potom lze nejlepší genotyp namnožit, ukazuje se, že je možné zmrazit somatická embrya v tekutém dusíku (zatím embrya vydržela a byla schopná regenerace rostlin po 1 roce), uchovávání embryogenních kultur je možné i při snížené teplotě a subkultivačním intervalu 1 rok (přežití kultur je asi 80 %)

haploidní kultury - uvažuje se i této možnosti pro získání čistých linií, křížení elitních genotypů, produkce hybridů...

! ale těmito postupy může dojít k drastickému zúžení genetické základny populace, musíme si uvědomit, že je to kultura dlouholetá, a je nutno vidět na jedné straně specializaci na ekonomický výnos a na druhé straně schopnost přizpůsobit se podmínkám prostředí

Klonového množení lesních dřevin je možné dosáhnout pomocí orgánových, kalusových, suspenzních kultur - organogenezí nebo som.embryogenezí. Nejlepších výsledků se dosahuje pomocí orgánových kultur (meristémy, pupeny, embrya), úspěch závisí nejen na genotypu rostliny, složení média, fytohormonech (růst.regulátorech), ale i na fyziologickém stavu rostliny, zdravotním stavu, a na stáří rostliny.

U listnatých rostlin byla provedena regenerace a je možné i rychlé množení *in vitro* u téměř všech našich významných dřevin - dub, lípa, bříza, jeřáb, jasan,

jilm, habr, hloh, akát, třešeň, osika, topol, vrba. Rychlého klonového množení se dosahuje zejména stimulací růstu axilárních pupenů (množ.koef. je 104 - 108), zakořenění se daří u 60 - 95 % rostlinek, převod do půdy nebývá kritický.

U jehličnanů byla úspěšná regenerace *in vitro* u smrku, borovice, modřínu, douglasky. Množení je ale obtížnější, probíhá cestou indukce adventivních pupenů na embryích, vegetačních pupenech, a zejména u jehličnanů je perspektivní metoda som.embryogeneze.

Dřeviny, u kterých se podařilo získat celistvé rostliny (a převést je úspěšně do půdy):

| | |
|-------------------------------------|---------------------|
| <i>Larix decidua x L.leptolepis</i> | - nezr.embrya |
| <i>L.leptolepis x L.decidua</i> | - "- |
| <i>Picea abies</i> | - nezr.+dosp.embrya |
| <i>P. glauca</i> | - "- |
| <i>P. engelmannii</i> | - nezr.embrya |
| <i>P. mariana</i> | - dosp.embrya |
| <i>P. sitchensis</i> | - nezr.+dosp.embrya |
| <i>Pinus taeda</i> | - samičí gametofyt |
| <i>Pseudotsuga menziesii</i> | - nezr.embrya |

V souvislosti se som.embryogenezí se také hovoří o využití desikovaných nebo enkapsulovaných embryí jako metodě levného klonového množení, metodě pro uchovávání nebo produkci zdravých klonů ze selektovaných genotypů.

Tato umělá semena by měla být produkována v embryogenní suspenzní kultuře. Som.embrya se podařilo regenerovat ze suspenzních kultur u *Picea glauca*, *P.mariana*, *Pinus taeda*, *Pseudotsuga menziesii*.

Genové inženýrství - tyto techniky se uplatňují zejména ve snaze o vytváření produktivnějších odrůd lesních dřevin, vnášení cizorodé DNA do genomu (chemicky indukovaná endocytóza za využití PEG, vnášení DNA pomocí lipozómů, elektroporace, mikroprojektily) - cílem je např. získání genotypů rezistentních glyfosátu, navození rezistence vůči houbovým chorobám u jilmu...

Přehled využití jednotlivých technik *in vitro*:

Embryokultury:

- „záchrana“ embryí před aborcí při hybridizaci mezi taxonomicky vzdálenými druhy a jejich kultivace do dospělosti
- překonání dormance semen
- relativně snadná kultivace - okamžité použití - specifické požadavky na hormony a růstové faktory u raných stadií vývoje embryí

Meristémové kultury:

- eliminace chorob (zejména virových) z množeného rostlinného materiálu
- okamžité využití, jestliže je rostlinu možné kultivovat *in vitro*
- meristémová kultura nabo termoterapie nezaručuje, že materiál bude zbaven virů. Je nutné ověření, že materiál je viruprostý (ELISA).

Mikropropagace:

- rychlé namnožení elitních rostlin při zachování jejich genotypu
- udržování materiálu v kontrolovaných podmínkách
- uchovávání „zárodečné plazmy“
- okamžitá aplikace, ale možnost využití mikropropagace *in vitro* není u všech druhů stejná a dokonce některé genotypy v rámci druhu - nelze množit *in vitro* nebo je to velmi obtížné. Obecně - bylinné druhy jsou více „přístupnější“ technikám *in vitro* kultivace než dřeviny.
- somaklonální varibilita může být u některých mikropropagačních technik problematickou, je doporučováno zkoušení rostlin v polních podmínkách - ověření pravosti genotypu a vyloučení genetických variant

Somatická embryogeneze:

- rychlé namnožení žádoucích rostlin při zachování genotypu výchozího materiálu

- regenerace z kalusu nebo buněčné suspenze je obtížnější než mikropropagace.

Časově náročnější a obtížnější je vytvoření úspěšného technologického postupu regenerace, zejména u problematických druhů a genotypů - větší nároky na technické vybavení, zejména u buněčných suspenzí

- regenerace u dediferencovaných buněk zvyšuje somaklonální variabilitu

Somaklonální variabilita:

- indukce žádoucích, dědičných změn u regenerovaných rostlin
- regenerace z kalusu a buněčných suspenzí nese stejné problémy a omezení jako u SE - ne všechny změny jsou žádoucí, spíše jsou většinou škodlivé nebo bez možnosti agronomického využití
- lepší využití je u vegetativně množených materiálů s omezenou genetickou základnou - skreening mnoha tisíc rostlin na užitečné znaky je drahý a časově náročný; vhodnější je, pokud selekční tlak působí na buněčné úrovni

In vitro selekce:

- indukce žádoucích, dědičných změn u regenerovaných rostlin vystavením populace buněk selekčnímu tlaku
- regenerace z kalusu a buněčných suspenzí nese stejné problémy a omezení jako u SE
- důležitý je vypracovaný opakovatelný systém regenerace velkého množství rostlin z neovlivněných buněk (selekční agens může snížit schopnost regenerovat rostliny)
- důležité je, aby se tolerance ke stresu projevila jak na buněčné úrovni tak na úrovni celistvé rostliny (pak je větší šance získání žádoucích rostlin), naneštěstí mnoho agronomicky důležitých vlastností je polygenně založeno a závisí na strukturální a fyziologické integritě celé rostliny

Prašníkové (pylové) kultury:

- produkce homozygotů, čistých linií rostlin - pro produkci hybridů a genetickou analýzu
- zvýšení účinnosti *in vitro* selekce
- regenerace z kalusu a buněčných suspenzí, mikrospor nese stejné problémy a omezení jako u SE
- důležité je zvýšení frekvence regenerace a schopnost rozlišení rostlin regenerovaných z haploidní somatické tkáně prašníku - kolchicinací lze zdvojit počet chromozómů haploidních rostlin

Protoplastové kultury:

- vnešení potencionálně užitečných genů z jednoho rostlinného druhu do jiného - fúze protoplastů a regenerace rostlin z hybridních buněčných linií, somatická hybridizace
- přenos specifických genů do protoplastů a regenerace transgenních rostlin
- protoplasty jsou buňky, ze kterých je buněčná stěna odstraněna mechanickými nebo enzymatickými metodami, ještě větší obtíže a omezení při kultivaci a regeneraci
- nároky na technické vybavení
- regenerace rostlin z protoplastů je obecně velmi obtížná a komplikovaná, genotypově silně závislá